

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

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

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 20
2024

4





Уважаемые авторы, читатели, коллеги, дорогие друзья!

Поздравляем всех с Новым годом и Рождеством!

В 2024 году мы выпустили 5 номеров журнала, в которых опубликовали 83 статьи, включая материалы ежегодно проводимой нашим Центром научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование».

Наука – это бесконечный поиск, постоянно находящий решения и ставящий новые задачи, а технологии – это получаемый практический результат. Мы напоминаем о новой рубрике нашего журнала – «Биотехнология», в нашем случае это биотехнологии в биомедицинском аспекте.

15 ноября 2024 года Правительством Российской Федерации скорректированы требования, касающиеся формирования системы оценки научных исследований и разработок: вместо публикаций в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, будут учитываться публикации в журналах «Белого списка», в который включён наш журнал.

В этом году мы пересмотрели Правила направления и опубликования рукописей. Обновлённая редакция Правил приведена на последних страницах этого номера, также вы можете ознакомиться с ней на сайте журнала. Но мы не меняем своих основных принципов: публикации статей по-прежнему бесплатны для авторов, все они безвозмездно получают экземпляр журнала со своей статьёй.

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

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

Отдельно поздравляем заместителя главного редактора нашего журнала – Игоря Анатольевича Помыткина – с успешной защитой диссертации и присвоением учёной степени доктора биологических наук. Желаем Игорю Анатольевичу новых ярких высот!

Всем друзьям нашего журнала желаем мира, здоровья и счастья!

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

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2024, Том 20, № 4

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. 4

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 «МЕДИАКОЛОП» 127273, Москва, Сигнальный пр-д, 19, стр. 1
Дата выхода в свет:	10.12.2024

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

■ Editor-in-Chief

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

■ Deputy Editors-in-Chief

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof.
Igor A. Pomytkin, Cand. Sci. (Chem.)

■ Executive Secretary

Oksana V. Alimkina

■ Members of Editorial Council

Konstantin V. Anokhin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)
Evgeniy E. Achkasov, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)
Viktor M. Baranov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)
Vitan Vlahov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the Bulgarian Academy of Sciences and Arts (Sofia, Bulgaria)
Pavel A. Galenko-Yaroshevskiy, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Krasnodar, Russia)
Mikhail V. Dubina, Dr. Sci. (Med.), Acad. of the RAS (Moscow, Russia)
Aleksandr M. Dygay, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Tomsk, Russia)
Kenes T. Erimbetov, Dr. Sci. (Biol.) (Borovsk, Kaluga Region, Russia)
Oleg I. Kit, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Rostov-on-Don, Russia)
Leonid V. Kovalenko, Dr. Sci. (Chem.), Prof. (Moscow, Russia)
Aleksandr E. Kuznetsov, Dr. Sci. (Tech.), Prof. (Moscow, Russia)
Vladimir V. Martirosyan, Dr. Sci. (Tech.), Prof. of the RAS (Moscow, Russia)
Anatoliy I. Miroshnikov, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)
Arkadiy N. Murashev, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (Pushchino, Moscow Region, Russia)
Vladimir N. Nikolenko, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)
Sergey V. Okovityi, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Saint Petersburg, Russia)
Konstantin S. Ostrenko, Dr. Sci. (Biol.) (Borovsk, Kaluga Region, Russia)
Vsevolod G. Pinelis, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)
Sergey Yu. Pchelintsev, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Lyubuchany, Moscow Region, Russia)
Galina V. Ramenskaya, Dr. Sci. (Pharm.), Prof. (Moscow, Russia)
Vladimir R. Rembovsky, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Kuzmolovskiy, Leningrad Region, Russia)
Igor V. Reshetov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)
Andrey V. Safronenko, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Rostov-on-Don, Russia)
Dmitriy A. Sychev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)
Liliya V. Fedulova, Dr. Sci. (Tech.), Prof. of the RAS (Moscow, Russia)
Dmitriy F. Khritinin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)
Boris D. Tsygankov, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Moscow, Russia)
Evgenia V. Shikh, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)
Evgeniy B. Shustov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the Russian Academy of Natural Sciences (Saint Petersburg, Russia)
Anatoliy T. Shchastnyj, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Vitebsk, Republic of Belarus)

JOURNAL BIOMED

Biomeditsina

Founded:	The journal has been published since 2005.
Frequency:	Quarterly
DOI Prefix:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Mass media registration certificate:	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 of 09.06.2005
Indexing:	The Journal is included into the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading per-reviewed scientific journals recommended for publishing the basic research results of doctor and candidate theses)
Subscription index:	57995 in the combined catalogue "Pressa Rossii"
Price:	400 RUR
Content distribution terms:	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Founders:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye gory Village, 1
Publisher:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye gory Village, 1
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye gory Village, 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Circulation:	3000 copies
Printing house:	MediaColor LLC 127273, Russian Federation, Moscow, Signalny proezd, 19
Publication date:	10.12.2024

■ БИОТЕХНОЛОГИИ В БИОМЕДИЦИНЕ**С.В. Генералов, А.А. Савенкова, М.Н. Киреев, Е.Г. Абрамова,
И.В. Шульгина, О.А. Лобовикова**Оценка молекулярных параметров иммуноглобулина антирабического
методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 8**М.М. Курноскина, И.В. Жарникова, Д.В. Русанова, А.Г. Кошкидько,
Е.В. Жданова, Д.Г. Пономаренко**Биотехнология получения диагностикума латексного бруцеллёзного
антигенного на основе полиакролеиновых микросфер 18**■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ****К.А. Макавеева, Е.Г. Киркина, Д.С. Гайдай**Определение чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам на примере
культур немелкоклеточного рака лёгкого *in vitro* 27**М.Ю. Раваева, И.В. Черетаев, Е.Н. Чуян, М.В. Нагорская,
П.А. Галенко-Ярошевский**Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты
на стрессиндуцированные изменения гематологических показателей у крыс 37**Е.В. Черешнева, Д.А. Цомартова, М.Ю. Иванова, Э.С. Цомартова, Т.А. Ломановская,
М.С. Павлова, Э.Ф. Баринов, О.В. Паюшина**Динамика структурных изменений в почках крыс с различной адренореактивностью
при моделировании односторонней обструкции мочеточника 48**Е.И. Чумасов, Е.С. Петрова, Д.Э. Коржевский**Иммуногистохимическое исследование нейроглии в структурах
средостения новорождённой крысы 59**■ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ****Г.А. Демьяшкин, В.А. Якименко, М.А. Вадюхин, Д.И. Угурчиева, С.Н. Корякин**Характеристика стромального компонента печени после введения
аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита 70**Е.С. Самакина**Оценка влияния этилкарбамата на CD21⁺-клетки селезёнки 78

■ BIOTECHNOLOGIES IN BIOMEDICINE

Sergey V. Generalov, Anastasia A. Savenkova, Mikhail N. Kireev, Elena G. Abramova, Irina V. Shulgina, Oksana A. Lobovikova

Evaluation of the Molecular Size Distribution of Rabies Immunoglobulin Using High-Performance Liquid Chromatography 8

Mariya M. Kurnoskina, Irina V. Zharnikova, Diana V. Rusanova, Aleksandra G. Koshkidko, Elena V. Zhdanova, Dmitriy G. Ponomarenko

Production Biotechnology for a Brucellosis Antigenic Latex Diagnosticum Based on Polyacrolein Microspheres 18

■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

Kseniya A. Makaveeva, Ekaterina G. Kirkina, Dmitriy S. Gaidai

Determination of Tumor Cell Sensitivity to Cytostatic Agents on the Example of Cultures of Non-Small Cell Lung Cancer *in vitro* 27

Marina Y. Ravaeva, Igor V. Cheretaev, Elena N. Chuyan, Mariya V. Nagorskaya, Pavel A. Galenko-Yaroshevskii

Effect of Low-Intensity Electromagnetic Radiation of Ultrahigh Frequency on Stress-Induced Changes in Hematological Parameters of Rats 37

Elizaveta V. Cheresheva, Dibakhan A. Tsomartova, Marina Yu. Ivanova, Elina S. Tsomartova, Tatyana A. Lomanovskaya, Mariya S. Pavlova, Eduard F. Barinov, Olga V. Payushina

Structural Changes in the Kidneys of Rats with Different Adrenoreactivity in Modeled Unilateral Ureteral Obstruction 48

Evgenii I. Chumasov, Elena S. Petrova, Dmitry E. Korzhevskii

Immunohistochemical Study of Neuroglia in the Mediastinum Structures of Newborn Rats 59

■ NON-CLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE

Grigory A. Demyashkin, Vladislav A. Yakimenko, Matvey A. Vadyukhin,

Dali I. Ugurchieva, Sergey N. Koryakin

Characteristics of the Fibrous Component of the Liver after Administration of Ascorbic Acid in a Radiation Hepatitis Model 70

Ekaterina S. Samakina

Evaluation of the Effect of Ethyl Carbamate on CD21⁺-Spleen Cells 78



ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПАРАМЕТРОВ ИММУНОГЛОБУЛИНА АНТИРАБИЧЕСКОГО МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

С.В. Генералов^{1,*}, А.А. Савенкова¹, М.Н. Киреев¹, Е.Г. Абрамова^{1,2},
И.В. Шульгина¹, О.А. Лобовикова¹

¹ ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
410005, Российская Федерация, Саратов, ул. Университетская, 46

² ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики,
биотехнологии и инженерии им. И.Н. Вавилова»
410012, Российская Федерация, Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина, 4, стр. 2

В Российской Федерации ежегодно риску заражения бешенством подвергается более 400 тыс. человек, в связи с чем антирабический иммуноглобулин является одним из наиболее часто применяемых противовирусных сывороточных препаратов. Для повышения лекарственной безопасности при использовании гетерологичного иммуноглобулина целесообразным является введение показателя качества «молекулярные параметры», отражающего распределение в препарате одиночных молекул иммуноглобулина, их димеров, агрегатов и фрагментов. Исследование содержания указанных фракций в препарате методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяется требованиями XIV издания Государственной Фармакопеи Российской Федерации. Цель работы состояла в определении условий проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения молекулярных параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина. В статье предложена методика определения показателя «молекулярные параметры» с использованием колонки BioSep-SEC-s3000 («Phenomenex Inc.», США) и хроматографической системы Biologic Duoflow («BioRad», США). В качестве объекта исследования использовали производственные образцы антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. При исследовании хроматографических параметров (разрешения между пиками, времени удерживания, симметрии пиков и др.) подобраны условия проведения анализа, удовлетворяющие фармакопейным требованиям. Значения разрешения составили: между пиками мономеров и димеров — 1,42; между пиками агрегатов и мономеров — 3,9; между пиками мономеров и фрагментов — не менее 4,46. Результаты эксперимента показали специфичность и повторяемость методики. Дополнительно показана высокая степень очистки исследуемых коммерческих образцов антирабического иммуноглобулина, которую характеризует отсутствие фракций агрегатов и фрагментов. Полученные результаты позволяют сделать вывод о возможности применения предлагаемой методики с использованием колонки BioSep-SEC-s3000 и хроматографической системы Biologic Duoflow для контроля качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина по показателю «молекулярные параметры».

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, контроль качества, молекулярные параметры, высокоэффективная жидкостная хроматография

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Генералов С.В., Савенкова А.А., Киреев М.Н., Абрамова Е.Г., Шульгина И.В., Лобовикова О.А. Оценка молекулярных параметров иммуноглобулина антирабического методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Биомедицина*. 2024;20(4):8–17. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-8-17>

Поступила 15.02.2024

Принята после доработки 22.04.2024

Опубликована 10.12.2024

EVALUATION OF THE MOLECULAR SIZE DISTRIBUTION OF RABIES IMMUNOGLOBULIN USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Sergey V. Generalov^{1,*}, Anastasia A. Savenkova¹, Mikhail N. Kireev¹,
Elena G. Abramova^{1,2}, Irina V. Shulgina¹, Oksana A. Lobovikova¹

¹ Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya Str., 46

² Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov
410012, Russian Federation, Saratov, Petra Stolypina Ave., 4, building 3

Rabies immunoglobulin is one of the most commonly used antiviral serum drugs. In the Russian Federation, more than 400,000 people are at risk of contracting rabies every year. In order to improve the drug safety when using heterologous immunoglobulin, it is advisable to introduce such a quality indicator as molecular size distribution. This indicator reflects the distribution of single immunoglobulin molecules, their dimers, aggregates, and fragments in the drug. The study of the content of these fractions in the drug using high-performance liquid chromatography is determined by the requirements of the XIV edition of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The aim of the present study was to establish the conditions for high-performance liquid chromatography when determining the molecular size distribution of heterologous rabies immunoglobulin. A method for determining the indicator of molecular size distribution using a BioSep-SEC-s3000 ("Phenomenex Inc.", USA) column and a Biologic Duoflow ("BioRad", USA) chromatographic system is proposed. Commercial and experimental samples of rabies immunoglobulin obtained from horse blood serum were used. When studying chromatographic parameters (resolution between peaks, retention time, peak symmetry, etc.), analysis conditions in accordance with the pharmacopoeial requirements were selected. The resolution values were: between the peaks of monomers and dimers — 1.42; between the peaks of aggregates and monomers — 3.9, between the peaks of monomers and fragments — at least 4.46. The experiment showed the specificity and repeatability of the technique. Additionally, a high degree of purification of the studied commercial samples of rabies immunoglobulin was shown, which is characterized by the absence of fractions of aggregates and fragments. The results obtained allow us to conclude that the proposed method can be used using a BioSep-SEC-s3000 column and a Biologic Duoflow chromatographic system to control the quality of heterologous rabies immunoglobulin in terms of molecular size distribution.

Keywords: rabies immunoglobulin, quality control, molecular size distribution, high-performance liquid chromatography

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

For citation: Generalov S.V., Savenkova A.A., Kireev M.N., Abramova E.G., Shulgina I.V., Lobovikova O.A. Evaluation of the Molecular Size Distribution of Rabies Immunoglobulin Using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal Biomed.* 2024;20(4):8–17. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-8-17>

Submitted 15.02.2023

Revised 22.04.2024

Published 10.12.2024

Введение

Антирабический иммуноглобулин представляет собой иммунобиологический лекарственный препарат, применяемый для постэкспозиционной профилактики

бешенства, заболевания с абсолютной летальностью. Риск заражения возникает после укусов подозрительных на бешенство животных, попадания слюны на раневые поверхности. В России ежегодное число

пострадавших от укусов дикими и домашними животными составляет около 400 тыс. человек [6]. Введение антирабического иммуноглобулина позволяет обеспечить защиту организма от действия вируса до начала появления собственных антител, образующихся в ответ на введение антирабической вакцины. В России зарегистрирован единственный выпускаемый препарат отечественного производства — иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади; а также зарубежные препараты иммуноглобулина, получаемого из сыворотки крови человека (Китай, Израиль) [5].

Одним из критериев иммунобиологической безопасности и эффективности препаратов иммуноглобулина является отсутствие или допустимое содержание агрегированных молекул антител либо их фрагментов. Распределение фракций препарата иммуноглобулина по молекулярной массе отражает показатель качества «молекулярные параметры» [13]. В настоящее время в России показатель «молекулярные параметры» определяют только для иммуноглобулиновых препаратов, полученных из сыворотки крови человека. Среди гетерологичных сывороточных препаратов таковому контролю подлежит лишь противосибирезвенный иммуноглобулин из сыворотки крови лошади (ФС.3.3.2.00015.18 «Имуноглобулин противосибирезвенный из сыворотки крови лошади»). Разрабатываемый препарат гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки Эбола также предложено контролировать по этому параметру [2, 3]. Подобная инициатива связана с повышением безопасности применения гетерологичных сывороточных препаратов, а также необходимостью гармонизации российской и зарубежной фармакопейной документации. Следует отметить, что согласно Европейской Фармакопее, контролю по показателю «молекулярные параметры» подлежат все иммуноглобулиновые препа-

раты, предназначенные для парентерального введения, независимо от происхождения. Исследования, включающие обоснование показателя «молекулярные параметры» для различных иммуноглобулиновых препаратов и разработку методов его определения, также актуальны и за рубежом [7, 8, 14].

Ранее для контроля по показателю «молекулярные параметры» гетерологичного антирабического иммуноглобулина российского производства был предложен метод, основанный на гель-фильтрации низкого давления [1]. В настоящее время требования действующей Государственной Фармакопеи (ГФ РФ XIV изд.) для определения данного показателя подразумевают применение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Целью настоящего исследования являлись экспериментальный поиск условий проведения ВЭЖХ и оценка их эффективности для определения молекулярных параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

Материалы и методы

Объектом исследования явились образцы производственных серий антирабического иммуноглобулина, полученного из сыворотки крови лошади риванольно-спиртовым методом осаждения [4].

Для анализа фракций использовали колонку BioSep-SEC-s3000 («Phenomenex Inc.», США; длина колонки — 300 мм, диаметр — 7,8 мм), наполненную гидрофильным силикагелем с размером частиц 5 мкм и диаметром пор 29 нм, и хроматографическую систему Biologic Duoflow («BioRad», США) с ультрафиолетовым детектором с длиной волны 280 нм. Для подготовки проб и элюирования использовали натрий-фосфатный буферный р-р (pH=7,4±0,1) с концентрацией 0,1 моль/л. Концентрация белка в подготовленных образцах соответствовала значению 1,0±0,2 мг/мл.

Элюирование осуществляли со скоростью потока 1 мл/мин при температуре $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Температура проб и элюирующего буферного р-ра соответствовали температуре проведения анализа. Максимальное давление в системе соответствовало значению $4,5 \pm 0,5$ МПа. Объём наносимого образца составлял 10 ± 2 мкл, что соответствовало условиям, рекомендованным производителями колонки. Каждый образец исследовали не менее трёх раз.

Для проверки разделяющей способности хроматографической системы использовали набор молекулярных маркеров для эксклюзионной ВЭЖХ, содержащий вещества с молекулярной массой в диапазоне от 29 до 700 кДа (Sigma, MWGF1000-1KT). Указанный набор соответствовал требованиям ОФС 1.8.2.0006.15 «Определение молекулярных параметров методом ВЭЖХ».

Запись и анализ хроматограмм осуществляли с применением программного обеспечения Biologic Duoflow Software, version 5.2. Анализ хроматограмм осуществляли в соответствии с ГФ РФ XIV изд., ОФС 1.2.1.2.0001.15 «Хроматография». Содержание каждой фракции в процентах определяли методом нормирования. Для расчёта содержания фракций использовали формулу:

$$X_i = \frac{S_i \times 100\%}{\sum_{i=1}^n S_i}$$

где X_i — содержание фракции, %; S_i — площадь пика, соответствующего определяемой фракции, мм^2 ; $\sum_{i=1}^n S_i$ — сумма площадей всех пиков хроматограммы.

С целью установления специфичности предлагаемой методики осуществляли искусственную модификацию фракционного состава исследуемого препарата. Для этого использовали метод «ускоренного старения» в соответствии с ОФС 1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств». Образец выдерживали при температуре $41 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 сут, что эквивалентно двум годам хранения

при условиях хранения, указанных в нормативной документации.

Результаты исследований

Для оценки разделяющей способности используемой хроматографической системы осуществляли анализ компонентов набора молекулярных маркеров как по отдельности, так и их смеси. Для определения времени удерживания компонентов, входящих в набор молекулярных маркеров, элюировали натрий-фосфатным буфером (концентрация — 0,1 моль/л, $\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$) со скоростью потока от 1,0 мл/мин. На основании результатов этих исследований определены значения времени удерживания белка в зависимости от его молекулярной массы (рис. 1).

Хроматографический профиль элюции, характерный для образцов производственных серий антирабического иммуноглобулина, изображён на рис. 2.

При этом основному пику соответствует фракция мономеров (время удерживания — $9,8 \pm 0,03$ мин, коэффициент распределения — $K_0 = 0,52$). Пик димеров выходит непосредственно перед пиком мономеров (время удерживания — $8,6 \pm 0,03$ мин, коэффициент распределения — $K_0 = 0,52$). Фактор симметрии для основного пика составил $A_s = 1,6$. Эффективность хроматографической системы по числу теоретических тарелок соответствовала значению $N = 1640$.

На рис. 3 представлен профиль элюции препарата антирабического иммуноглобулина, подвергнутого искусственной модификации. Результатом явилось появление в профиле элюции агрегированных молекул и фракций фрагментов, которые отсутствовали в образцах коммерческих серий. При этом фракции полимеров и агрегатов с молекулярной массой более 300 кДа соответствуют пики с временем удерживания меньшим, чем у димеров. Фракции, выходящие после основного пика, соответству-

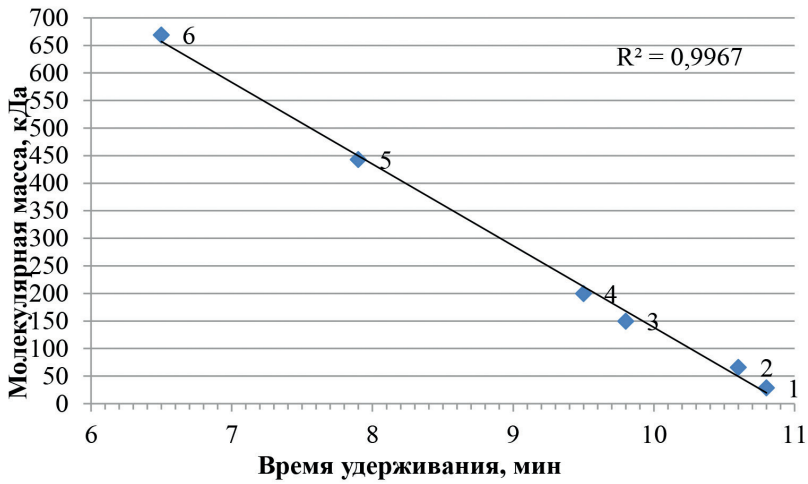


Рис. 1. Зависимость времени удерживания от молекулярной массы: 1 — карбоангидраза (29 кДа), 2 — бычий сывороточный альбумин (66 кДа), 3 — алкогольдегидрогеназа (150 кДа), 4 — бета-амилаза (200 кДа), 5 — апоферритин (443 кДа), 6 — тиреоглобулин (669 кДа).

Fig. 1. Dependence of retention time on molecular weight: 1 — carbonic anhydrase (29 kDa), 2 — bovine serum albumin (66 kDa), 3 — alcohol dehydrogenase (150 kDa), 4 — beta-amylase (200 kDa), 5 — apoferritin (443 kDa), 6 — thyroglobulin (669 kDa).

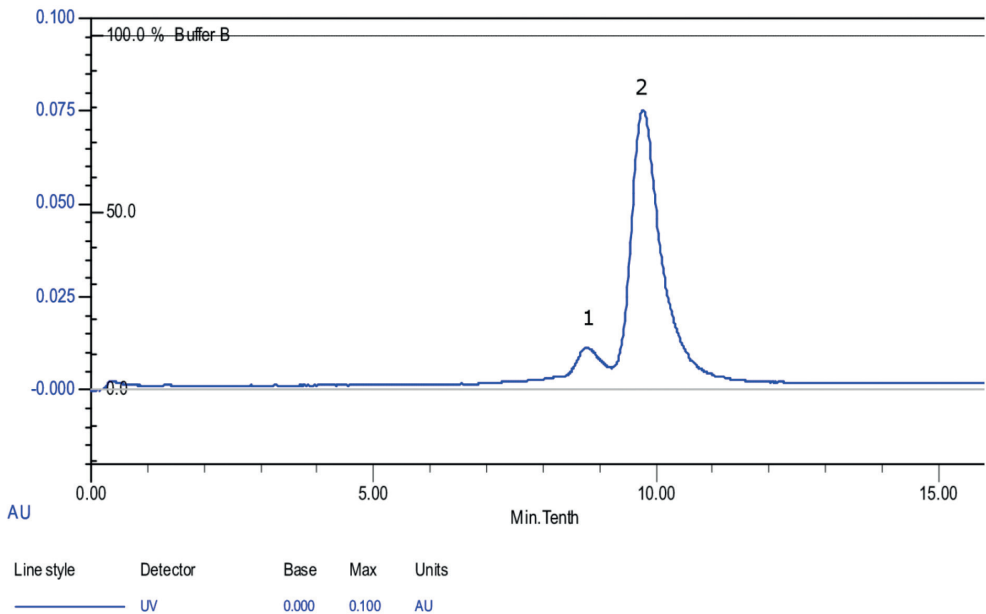


Рис. 2. Профиль элюции антирабического иммуноглобулина: 1 — фракция димеров, 2 — фракция мономерных молекул. Ось абсцисс — время удерживания, мин; ось ординат — величина оптического поглощения, AU.

Fig. 2. Elution profile of rabies immunoglobulin: 1 — fraction of dimers, 2 — fraction of monomer molecules. Abscissa axis — retention time, min; ordinates axis — optical absorption value, AU.

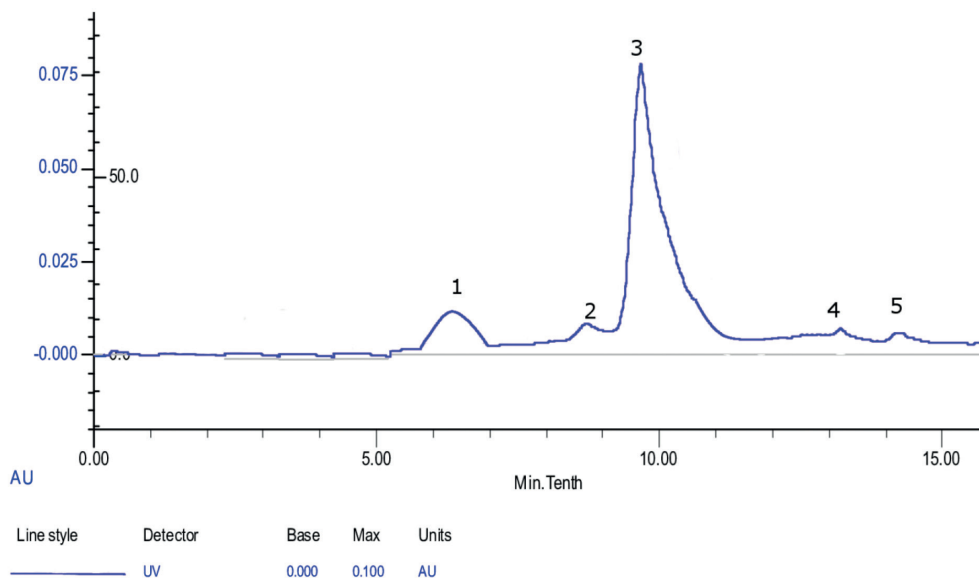


Рис. 3. Профиль элюции модифицированного антирабического иммуноглобулина: 1 — фракция агрегированных молекул, 2 — фракция димеров, 3 — фракция мономерных молекул, 4, 5 — фракции фрагментированных молекул. Ось абсцисс — время удерживания, мин; ось ординат — величина оптического поглощения, AU.

Fig. 3. Elution profile of modified rabies immunoglobulin: 1 — fraction of aggregated molecules, 2 — fraction of dimers, 3 — fraction of monomer molecules, 4, 5 — fractions of fragmented molecules. Abscissa axis — retention time, min; ordinates axis — optical absorption value, AU.

ют фрагментированным молекулам с молекулярной массой менее 150 кДа.

После проведения исследований получили результаты молекулярно-массового распределения (табл.) производственных серий гетерологичного антирабического иммуноглобулина (образцы 1–8), а также образцов, подвергшихся воздействию внешних факторов (образцы 9–11).

Обсуждение результатов

Результаты испытаний сывороточных препаратов на содержание агрегированных и фрагментированных молекул иммуноглобулина являются одним из критериев качества и безопасности их применения. В растворе гамма-глобулина образуют устойчивые комплексы из двух и более молекул. Подобные комплексы, с одной стороны, могут усиливать иммунный ответ, а с другой, могут быть причиной развития

побочных реакций, таких как гиперчувствительность замедленного типа или анафилактиксия. Фрагментация молекул иммуноглобулина может снижать его специфичную активность и приводить к ускоренному выведению из организма [10, 12].

Необходимо отметить, что требования Государственной Фармакопеи РФ к иммуноглобулиновым препаратам по показателю «молекулярные параметры» отличаются в зависимости от их применения и способа введения. Для препаратов иммуноглобулина человека, предназначенных для внутримышечного и подкожного введения, общее содержание мономеров и димеров должно составлять не менее 85%, полимеров — не более 10% (ФС.3.3.2.0007.15 «Имуноглобулин человека нормальный», ФС.3.3.2.0009.18 «Имуноглобулин человека противостафилококковый», ФС.3.3.2.00010.18 «Имуноглобулин человека проти-

Таблица. Результаты исследования фракционного состава антирабического иммуноглобулина
Table. Fractional composition of rabies immunoglobulin

Номер образца	Мономеры IgG, %		Димеры IgG, %		Агрегаты IgG, %		Фрагменты IgG, %	
	Содержание, %	Площадь пика, 10 ⁻³ АУ×с	Содержание, %	Площадь пика, 10 ⁻³ АУ×с	Содержание, %	Площадь пика, 10 ⁻³ АУ×с	Содержание, %	Площадь пика, 10 ⁻³ АУ×с
1	96,73±0,682	197,0±1,43	3,27±0,682	7,0±1,43	0,0	0	0,0	0
2	99,02±0,839	169±2,87	0,98±0,839	2,0±1,43	0,0	0	0,0	0
3	92,44±0,605	187±1,43	7,56±0,605	15,0±1,43	0,0	0	0,0	0
4	93,77±0,813	161±1,43	6,23±0,813	11,0±1,43	0,0	0	0,0	0
5	92,42±0,766	195±2,87	7,58±0,766	13,0±1,43	0,0	0	0,0	0
6	97,02±0,043	192±4,97	2,98±0,043	6,0±1,43	0,0	0	0,0	0
7	98,81±0,078	168±1,43	1,19±0,078	2,0±0,14	0,0	0	0,0	0
8	83,25±0,462	144±1,43	7,85±0,806	12,0±1,43	0,0	0	0,0	0
9	81,55±0,543	192±1,43	6,67±0,616	15,0±1,43	3,7±0,52	9±1,24	6,38±0,636	15±1,43
10	81,82±1,4	144±1,43	4,33±0,813	8,0±1,43	6,03±0,74	11±1,43	8,1±0,712	14±1,43
11	84,49±1,753	163±1,43	5,86±0,564	11,0±1,43	2,27±0,257	6±1,43	6,38±0,549	12±1,43

востолбнячный», ФС.3.3.1.0039.15 «Иммуноглобулин человека противооспенный, р-р для внутримышечного введения»). В отношении иммуноглобулиновых препаратов, предназначенных для внутривенного введения, общее содержание мономеров и димеров должно составлять не менее 90%, а содержание агрегатов — не более 3% (ФС.3.3.2.0008.15 «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения», ФС.3.3.2.00011.18 «Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутривенного введения»). При этом требования к фрагментированным молекулам не регламентируются. Однако в отношении противоаллергического иммуноглобулина человека предъявляются требования к содержанию не только фрагментов (не более 5%), но и мономеров и димеров в качестве отдельных фракций: не менее 85% и не более 15% (ФС.3.3.2.00013.18 «Иммуноглобулин человека противоаллергический»). Для противосибиреязвенного иммуноглобулина, единственного гетерологичного иммуноглобулинового препарата, контролируемого по показателю «молекулярные параметры», XIV изд. ГФ РФ устанавливает сле-

дующие требования: содержание мономеров и димеров должно быть не менее 85%, полимеров и агрегатов — не более 15%, фрагменты должны отсутствовать (ФС.3.3.2.00015.18 «Иммуноглобулин противосибиреязвенный из сыворотки крови лошади»).

Для гетерологичного антирабического иммуноглобулина требования к его молекулярному составу не установлены, но существуют значения, рекомендованные экспертами Научного центра экспертизы средств медицинского применения: содержание мономеров и димеров в исследуемом образце должно соответствовать 80%, содержание агрегатов и фрагментов — не более 20% [1]. При этом необходимо отметить, что разработанный ранее метод определения молекулярных параметров антирабического иммуноглобулина не позволял оценивать содержание димеров вследствие особенностей метода гель-фильтрации низкого давления.

В настоящей работе на первом этапе показана оценка разделяющей способности используемой хроматографической системы. Проведённые исследования по-

зволили оценить время выхода белков в зависимости от их молекулярной массы и спрогнозировать хроматографические параметры для фракционных компонентов препарата иммуноглобулина, которые были подтверждены на дальнейших этапах исследования (рис. 2, 3). Для агрегированных молекул (более 300 кДа) время удерживания составляет менее 8 мин, для димеров (300 кДа) — $8,6 \pm 0,1$ мин, для фрагментов иммуноглобулина — более 10 мин. При расчёте относительного содержания агрегатов и фрагментов учитывали те пики, площадь которых в три раза превышала площадь пиков, соответствующих шуму базовой линии [11].

Анализ хроматограмм (рис. 2 и 3) позволяет сделать выводы о достаточном разделении агрегированных и фрагментированных молекул иммуноглобулина по отношению к основному пику на основании требований ГФ РФ в соответствии с ОФС 1.2.1.2.0001.15 «Хроматография». Для пика, соответствующего димерам, относительное время удерживания составляет 0,87. Следует отметить, что 11-е издание фармакопеи Европейского Союза устанавливает указанное значение около 0,85 [9]. Эти справочные данные позволяют подтвердить специфичность метода, предлагаемого в настоящем исследовании.

Также следует подчеркнуть, что в исследуемых коммерческих сериях не обнаружено присутствия агрегированных или фрагментированных молекул (таб.), при этом предел обнаружения для фракций агрегатов и фрагментов на основании анализа дрейфа

базовой линии при исследовании образцов, подвергшихся изменению, составил 0,3%.

Образцы, представленные в таблице, также были исследованы повторно, через 24 ч после их приготовления и хранения при $20,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$. Результаты определения молекулярных параметров при этом не отличались от результатов, полученных ранее ($\text{RSD} < 2,0\%$). Подобные исследования позволяют оценить робастность метода, что необходимо в практическом отношении.

Выводы

Таким образом, для оценки показателя «молекулярные параметры» лекарственного средства «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади, жидкий» методом ВЭЖХ подобраны необходимые условия, предполагающие использование колонки, наполненной гидрофильным силикагелем с размером частиц 5 мкм и диаметром пор 29 нм, с размерами $300 \times 7,8$ мм, натрий-фосфатного буферного р-ра ($\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$) с концентрацией 0,1 моль/л для приготовления и элюции исследуемых образцов с концентрацией белка $1,0 \pm 0,2$ мг/мл.

Выявленные методом ВЭЖХ значения содержания фракций мономеров, димеров и полимеров в антирабическом иммуноглобулине свидетельствуют о высоком качестве очистки препарата и соответствии в целом требованиям Государственной Фармакопеи РФ по показателю «молекулярные параметры», предъявляемым к препаратам иммуноглобулинов другой специфичности для внутримышечного и подкожного введения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- 1 Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Кочкалова Н.Н., Генералов С.В., Селезнёва А.Г., Савицкая Л.В., Иванов Ю.В. Определение молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина методом гель-фильтрации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010;106(4):54–57. [Abramova E.G., Nikiforov A.K., Kireev M.N., Kochkalova N.N., Generalov S.V., Selezneva A.G., Savitskaya L.V., Ivanov Yu.V. *Opredelenie molekulyarnykh parametrov preparata geterologichnogo antirabicheskogo immunoglobulina metodom gel'-fil'tratsii* [Determination of the molecular parameters of heterologous anti-rabies immunoglobulin using gel-filtration]. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2010;106(4):54–57. (In Russian)]. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-4(106)-54-57

2. Мельников С.А., Борисевич И.В., Рождественский Е.В., Пантюхов В.В., Черникова Н.К., Гордеев Е.В., Нимирская С.А., Хмелев А.Л., Сыромятникова С.И., Шатохина И.В., Плеханова Т.М., Тиманькова Г.Д., Борисевич С.В., Кутаев Д.А., Стомба Л.Ф., Мишалова Е.Ю. Свойства гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки Эбола после длительного хранения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(1):50–59. [Melnikov S.A., Borisevich I.V., Rozhdstvensky E.V., Pantyukhov V.V., Chernikova N.K., Gordeev E.V., Nimirska-ya S.A., Khmelev A.L., Syromyatnikova S.I., Shatokhina I.V., Plekhanova T.M., Timankova G.D., Borisevich S.V., Kutaev D.A., Stovba L.F., Mishalova E.Yu. Svoystva geterologichnogo immunoglobulina protiv likhoradki Ebola posle dlitel'nogo khraneniya [Properties of heterologous anti-ebola immunoglobulin after long storage]. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]. 2020;20(1):50–59. (In Russian)]. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-20-1-50-59
3. Мишалова Е.Ю., Гордеев Е.В., Лебедев В.Н., Мельников С.А., Нимирская С.А., Борисевич С.В. Апробация методики эксклюзионной хроматографии для оценки молекулярных параметров иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):261–267. [Mishalova E.Yu., Gordeev E.V., Lebedev V.N., Melnikov S.A., Nimirska-ya S.A., Borisevich S.V. Aprobatsiya metodiki eksklyuzionnoy khromatografii dlya otsenki molekulyarnykh parametrov immunoglobulina protiv likhoradki Ebola iz syvorotki krovi loshadey [Experimental testing of a size-exclusion chromatography method used for evaluation of molecular parameters of equine anti-Ebola immunoglobulin]. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]. 2019;19(4):261–267. (In Russian)]. DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-4-261-267
4. Мовсесянц А.А., Бутырский А.Ю., Бондарев В.П., Олефир Ю.В., Постнова Е.Л., Мухачева А.В. К вопросу о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015;14(5):85–89. [Movsesyants A.A., Butyrskiy A.Yu., Bondarev V.P., Olefir Yu.V., Postnova E.L., Mukhacheva A.V. K voprosu o primeneniі geterologichnogo antirabicheskogo immunoglobulina dlya spetsificheskoy profilaktiki beshenstva u lyudey [On the issue of using heterologous anti-rabies immunoglobulin for specific prophylaxis of rabies in humans]. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika* [Epidemiology and Vaccinal Prevention]. 2015;14(5):85–89. (In Russian)]. DOI: 10.31631/2073-3046-2015-14-5-85-89
5. *Регистр лекарственных средств России*. [Register of medicines of the Russian Federation]. (In Russian)].
6. Репина И.Б., Феклисова Л.В., Скляр Л.Ф., Ушакова А.Ю., Россосанская Н.В., Соловьёва Н.П. Бешенство: обзор литературы и случай из практики. *Медицинский оппонент*. 2023;3(23):73–80. [Repina I.B., Feklisova L.V., Sklyar L.F., Ushakova A.Yu., Rossoshanskaya N.V., Solovyova N.P. Beshenstvo: obzor literatury i sluchay iz praktiki. [Rabies: literature review and case study]. *Meditsinskiy opponēt* [Medical Opponent]. 2023;3(23):73–80. (In Russian)].
7. Choi C.W., Jang W., Shim S.B., Song H.J., Cho J., Moon H., Park S.M., Han K., Sohn K.H. Collaborative study for the establishment of national reference standard for molecular size distribution test of human immunoglobulin products. *Yahhak HoeJi*. 2021;65:223–227. DOI: 10.17480/psk.2021.65.3.223
8. Christians S., Schluender S., van Treel N.D., Behr-Gross M.E. Interpretation of size-exclusion chromatography for the determination of molecular-size distribution of human immunoglobulins. *Pharmeuropa Bio & Scientific Notes*. 2016;2016:115–128.
9. *Human normal immunoglobulin (intramuscular administration)*, monograph 0338. (In Russian)]. Paris: Council of Europe, 2023.
10. Jiskoot W., Randolph T.W., Volkin D.B., Middaugh C.R., Schöneich C., Winter G., Friess W., Crommelin D.J., Carpenter J.F. Protein instability and immunogenicity: Roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release. *J. Pharm. Sci.* 2012;101(3):946–954. DOI: 10.1002/jps.23018
11. Lee J.K., Deluccia F.J., Kelly E.L., Davidson C., Borger F.R. Determination of the molecular size distribution of immunoglobulin G (IgG) in intravenous IgG-albumin formulations by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1988;444:141–152. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)94017-8
12. Roberts C.J. Therapeutic protein aggregation: Mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol.* 2014;32(7):372–380. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.05.005
13. Woznichak M., Vandeberg P., Russ C., Talton Ch., Srivastava J., Arora V., Merritt W.K., Jose M. Application of a caprylate/chromatography purification process for production of a high potency rabies immune globulin from pooled human plasma. *J. Immunol. Methods*. 2021;499:113–164. DOI: 10.1016/j.jim.2021.113164
14. Wang H., Levi M.S., Del Grosso A.V., McCormick W.M., Bhattacharyya L. An improved size exclusion-HPLC method for molecular size distribution analysis of immunoglobulin G using sodium perchlorate in the eluent. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017;138:330–343. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.02.025

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Генералов Сергей Вячеславович*, к.б.н.,
ФКУН Российский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора;
e-mail: svgeneraloff@gmail.com

Sergey V. Generalov*, Cand. Sci. (Biol.), Rus-
sian Research Anti-Plague Institute “Microbe”
of the Federal Service for Supervision of Consumer
Rights Protection and Human Welfare;
e-mail: svgeneraloff@gmail.com

Савенкова Анастасия Александровна, ФКУН
Российский противочумный институт «Микроб»
Роспотребнадзора;
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Anastasia A. Savenkova, Russian Research Anti-
Plague Institute “Microbe” of the Federal Service
for Supervision of Consumer Rights Protection
and Human Welfare;
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Киреев Михаил Николаевич, к.м.н., ФКУН
Российский противочумный институт «Микроб»
Роспотребнадзора;
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Mikhail N. Kireev, Cand. Sci. (Med.), Russian
Research Anti-Plague Institute “Microbe”
of the Federal Service for Supervision of Consumer
Rights Protection and Human Welfare;
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Абрамова Елена Геннадьевна, д.б.н., проф.,
ФКУН Российский противочумный институ-
т «Микроб» Роспотребнадзора, ФГБОУ ВО
«Саратовский государственный университет ге-
нетики, биотехнологии и инженерии им. И.Н. Ва-
вилова»;
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Elena G. Abramova, Dr. Sci. (Biol.), Prof.,
Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”
of the Federal Service for Supervision of Consumer
Rights Protection and Human Welfare, Saratov
State University of Genetics, Biotechnology
and Engineering named after N.I. Vavilov;
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Шульгина Ирина Витальевна, к.м.н., ФКУН
Российский противочумный институт «Микроб»
Роспотребнадзора;
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Irina V. Shulgina, Cand. Sci. (Med.), Russian
Research Anti-Plague Institute “Microbe” of the Fe-
deral Service for Supervision of Consumer Rights
Protection and Human Welfare;
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Лобовикова Оксана Александровна, к.б.н.,
ФКУН Российский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора;
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Oksana A. Lobovikova, Cand. Sci. (Biol.),
Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”
of the Federal Service for Supervision of Consumer
Rights Protection and Human Welfare;
e-mail: rusrapi@microbe.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДИАГНОСТИКУМА ЛАТЕКСНОГО БРУЦЕЛЛЁЗНОГО АНТИГЕННОГО НА ОСНОВЕ ПОЛИАКРОЛЕИНОВЫХ МИКРОСФЕР

М.М. Курноскина*, И.В. Жарникова, Д.В. Русанова, А.Г. Кошкидько,
Е.В. Жданова, Д.Г. Пономаренко

*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
355035, Российская Федерация, Ставрополь, ул. Советская, 13–15*

Цель исследования состояла в разработке биотехнологии производства диагностикума латексного бруцеллёзного антигенного на основе полиакролеиновых микросфер, предназначенного для выявления антител против бруцеллёза в реакции агглютинации латекса при исследовании сывороток крови людей. Отработаны оптимальные условия сенсибилизации латекса антигеном в соотношении 1:3 при температуре 45°C в течение 3 ч с последующей блокировкой активных центров 0,5% желатином. Исследования показали высокую эффективность препарата в перспективе его использования для диагностики бруцеллёза. Аналитическая чувствительность диагностикума составила не менее 1:2560, при отсутствии перекрёстных реакций с гетерологичными сыворотками. Контроль диагностических характеристик экспериментальных серий препарата показал их чувствительность — 80%, специфичность — 93,33%.

Ключевые слова: бруцеллёз, реакция агглютинации латекса, полиакролеиновые микросферы, антигены

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Курноскина М.М., Жарникова И.В., Русанова Д.В., Кошкидько А.Г., Жданова Е.В., Пономаренко Д.Г. Биотехнология получения диагностикума латексного бруцеллёзного антигенного на основе полиакролеиновых микросфер. *Биомедицина*. 2024;20(4):18–26. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-18-26>

Поступила 18.03.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 10.12.2024

PRODUCTION BIOTECHNOLOGY FOR A BRUCELLOSIS ANTIGENIC LATEX DIAGNOSTICUM BASED ON POLYACROLEIN MICROSPHERES

Mariya M. Kurnoskina*, Irina V. Zharnikova, Diana V. Rusanova, Aleksandra G. Koshkidko,
Elena V. Zhdanova, Dmitriy G. Ponomarenko

*Stavropol Research Anti-Plague Institute of the Federal Service for Supervision
of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing of Russia
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya Str., 13–15*

This research was aimed at developing a biotechnology for obtaining a latex brucellosis antigenic diagnosticum based on polyacrolein microspheres. This diagnosticum is intended for detecting antibodies against brucellosis in a latex agglutination reaction in human blood sera. Optimal conditions for latex sensitization with the antigen in the ratio of 1:3 at 45°C for 3 h followed by blocking of active centers with 0.5%

gelatin were determined. The developed preparation showed high efficiency, which confirmed its prospects for brucellosis diagnostics. The analytical sensitivity of the diagnosticum was not less than 1:2560, in the absence of cross-reactions with heterologous sera. The diagnostic characteristics of experimental series of the preparation in control testing showed a sensitivity of 80% and a specificity of 93.33%.

Keywords: brucellosis, latex agglutination reaction, polyacrolein microspheres, antigens

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

For citation: Kurnoskina M.M., Zharnikova I.V., Rusanova D.V., Koshkidko A.G., Zhdanova E.V., Ponomarenko D.G. Production Biotechnology for a Brucellosis Antigenic Latex Diagnosticum Based on Polyacrolein Microspheres. *Journal Biomed.* 2024;20(4):18–26. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-18-26>

Submitted 18.03.2024

Revised 03.06.2024

Published 10.12.2024

Введение

Бруцеллёз — заболевание, наиболее распространённое среди бактериальных зоонозов, которое наносит значительный экономический ущерб животноводству и представляет серьёзную угрозу общественному здравоохранению во всём мире [5]. Ежегодно во Всемирную организацию здравоохранения поступает информация о регистрации более 500 тыс. новых случаев заболевания людей бруцеллёзом [9, 11]. На территории Российской Федерации в среднем за последнее десятилетие ежегодно регистрировалось около 327 случаев заболеваний данным зоонозом [6].

Совершенствование комплекса лабораторной диагностики бруцеллёзной инфекции, полноценный клинический мониторинг инфекционного заболевания, контроль эффективности проводимой терапии, оценка напряжённости специфического иммунитета, индуцированного вакцинами, невозможны без надёжных и доступных для клинической лаборатории тестов, позволяющих оценить иммунологический статус и функциональную реактивность иммунной системы человека по отношению к возбудителю бруцеллёза [3].

Для совершенствования лабораторной диагностики необходимо создание простых и доступных методов исследования, что в свою очередь позволит сократить время проведения анализа и повысить досто-

верность полученных результатов. Один из таких методов — реакция агглютинации латекса (РАЛ), которая в последнее время получает всё большее распространение в мировой практике [4].

Простота и возможность постановки РАЛ практически в любых условиях делают её доступной для использования как в стационарных лабораториях любой степени оснащённости, так и в полевых условиях. Данный метод можно использовать и при одиночных, и при массовых исследованиях, что также добавляет ему ценности для лабораторной диагностики [2].

На мировом рынке представлен большой выбор латексных тест-систем для идентификации патогенов и серодиагностики инфекционных заболеваний: «Bio-Rad» (США), «Hardy diagnostics» (США), «Oxoid» (Великобритания), «HiMedia» (Индия), «BioMerieux» (Франция) и др.

Большинство латексных диагностикумов, зарегистрированных в России, предназначены для проведения слайд-агглютинации на специальных карточках или предметных стёклах, т. е. для проведения качественной реакции. Наиболее распространены наборы реагентов для определения С-реактивного белка и ревматоидного фактора в РАЛ (ЗАО «Эколаб», АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн», ООО фирмы «Имтек», ООО «Научно-производственная фирма «АБРИС+»,

ООО «Ольвекс Диагностикум»). В список отечественных латексных тест-систем также входят препараты для идентификации возбудителей инфекционных заболеваний производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (Оболонск): *Haemophilus influenzae* тип b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* тип A, *Neisseria meningitidis* тип B, *Neisseria meningitidis* тип C и *Neisseria meningitidis* тип W 135, *Listeria monocytogenes*, *Listeria pneumophila*, шигатоксинпродуцирующего штамма *Escherichia coli* O104:H4 и возбудителя геморрагического колита *Escherichia coli* O157:H7. Также ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» был зарегистрирован набор реагентов для определения *Francisella tularensis* путём проведения РАЛ в планшете с U-образным профилем лунок.

В ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» разрабатывают препарат на основе моноклональных антител для идентификации *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*, которые являются возбудителями мелиоидоза и сапа соответственно. Данный препарат предназначен для проведения только качественной реакции, т. е. без определения концентрации антигена в пробе [8].

На базе ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» сконструирован псевдотуберкулёзный видоспецифический антигенный полимерный диагностикум для объёмной реакции агглютинации на основе препарата белков наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* сероварианта O:1a [7].

В ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора ранее проводилась работа по получению латексного чумного антигенного диагностикума, причём для проведения как качественной реакции, так и количественной [1].

Практической целью исследований стала разработка биотехнологии получения диагностикума латексного бруцеллёзного антигенного на основе полиакролеиновых микросфер, предназначенного для выявления антител против бруцеллёза в РАЛ при исследовании сыворотки крови людей.

Материалы и методы

В качестве носителя биолигандов в работе использовали суспензию полиакролеинового латекса «Акрорал-К» с диаметром частиц $1,2 \pm 0,1$ мкм (ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия). 20% суспензию латекса разводили физ. р-ром (0,9% NaCl) до 2% концентрации.

Корпускулярный антиген, предназначенный для сенсibilизации латексных микросфер, получали из клеток штамма *Brucella (B.) abortus* 19 ВА, находящегося в рабочей коллекции ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Культуру *B. abortus* 19 ВА выращивали на агаре Альбими (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора) в суховоздушном термостате ТС-1/80 (ОАО «Смоленское СКТБСПУ», Россия) при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 72 ч. Затем в каждый матрац с культурой *B. abortus* 19 ВА вносили по 10 мл 12% р-ра NaCl, микробную биомассу смывали и пипеткой переносили во флаконы. Бактериальную массу обеззараживали прогреванием в жидкостной термобане ТЖ-ТБ-01/12Ц (ЗАО «Лабораторное Оборудование и Приборы», Россия) при 100°C в течение 60 мин. Специфическую стерильность проверяли бактериологическим методом. Обеззараженную взвесь доводили до концентрации 2×10^{10} м.к./мл в 12% р-ре NaCl с 0,5% фенола (ТУ 6-09-40-3245-90), добавляли 0,004% бриллиантового зелёного (ТУ 6-09-4278-88) и 0,002% генцианвиолета (ТУ 6-09-07-4119-75). Затем антиген, раз-

ведённый в 2,5 раза 0,9% р-ром NaCl, дезинтегрировали на приборе для ультразвуковой обработки Q125 («Qsonica LLC», США) в течение 2 мин при амплитуде колебаний 20% и режиме пульсации 10 через 5 сек. Титр полученного антигена в реакции агглютинации — не ниже 1:1000 (не менее 3+).

При изготовлении диагностикума использовали следующее оборудование: магнитная мешалка MSH-300i («Biosan», Латвия), центрифуга лабораторная ОПн-8 (ОАО «ТНК «ДАСТАН», Киргизия), холодильник с морозильной камерой LCv 4010 («Liebherr-Hausgeräte Lienz GmbH», Австрия).

В качестве блокирующих реагентов для получения специфических диагностикумов применяли желатин (ГОСТ 11293-2017), бычий сывороточный альбумин (БСА) («CDN», Австралия) и казеин (ГОСТ 31689-2012).

Для контроля аналитической чувствительности диагностикума использовали сыворотку диагностическую поливалентную бруцеллёзную сухую для реакции агглютинации (РА), титр 1:800 (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия) и экспериментальную серию сыворотки агглютинирующей бруцеллёзной для РА, титр 1:3200 (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия).

Контроль аналитической специфичности проводили с гетерологичными сыворотками: сыворотка диагностическая холерная О1 адсорбированная сухая для РА (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Россия); сыворотка диагностическая сальмонеллёзная адсорбированная О-поливалентная для РА (ЗАО «Эколаб», Россия); сыворотка диагностическая туляремийная сухая для РА (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия).

Оценку диагностических чувствительности и специфичности осуществляли с сыворотками крови больных бруцеллёзом и неиммунных к возбудителю бруцеллёза людей соответственно. Тепловую инактивацию сывороток в разведении 1:10 проводили в термобане жидкостной при $56 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Работа с кровью проводилась согласно требованиям СанПиН 3.3686-21 и МУК 3.1.7.3402-16.

Для подтверждения и сравнения результатов параллельно с РАЛ проводили исследования сывороток по методам Хеддельсона и Райта с применением «Диагностикума бруцеллёзного жидкого для реакции агглютинации, суспензии для диагностических целей» (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия), а также использовали тест-системы для проведения ИФА производства АО «Вектор-Бест»: Бруцелла-IgA-ИФА-БЕСТ, Бруцелла-IgM-ИФА-БЕСТ, Бруцелла-IgG-ИФА-БЕСТ.

Для постановок РАЛ применяли полимерные круглодонные планшеты для иммунологических реакций (ТУ 9398-057-00480230-2009). В двенадцать лунок каждого ряда планшета механическим восьмиканальным дозатором вносили по 50 мкл разводящей жидкости — Твин-80 («Applichem», Германия) в разведении 1:51000. В первые лунки каждого ряда механическим одноканальным дозатором вносили по 50 мкл инактивированных сывороток в разведении 1:10. Делали последовательные двукратные разведения переносом по 50 мкл из одной лунки в другую до одиннадцатых лунок включительно, из последних 50 мкл удаляли. Таким образом, получали конечные разведения сывороток от 1:20 до 1:20480. Постановку реакции с каждой сывороткой осуществляли в двух повторностях. Последнюю лунку ряда использовали для контроля диагностикума (К-) без внесения в неё сыворотки. После титрования во все лунки добавля-

ли по одной капле (20 мкл) диагностикума латексного бруцеллёзного антигенного 0,2%. Содержимое планшета осторожно перемешивали покачиванием и оставляли при комнатной температуре под крышкой.

Учёт результатов проводили визуально через 2,5–3 ч, степень агглютинации оценивали по 4-крестовой системе. Положительной считали реакцию на 3–4 креста (рис.).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью Microsoft Excel («Microsoft Corp.», США). Коэффициент корреляции рассчитывали по методу Пирсона, для оценки силы корреляционной связи использовали таблицу Чеддока. Доверительные интервалы получены методом Клоппера—Пирсона. При оценке диагностических характеристик препарата применяли методы доказательной медицины с использованием четырёхпольных таблиц [10].

Результаты и их обсуждение

При создании диагностикума важным моментом было определение оптимальной концентрации сенсibiliзирующего антигена и условий его иммобилизации на латексных микросферах.

Антиген, полученный после ультразвуковой дезинтеграции, был использован для иммобилизации латексных микросфер. 2% р-р латекса и дезинтегрированный бруцеллёзный антиген смешивали в следующих соотношениях: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4. Иммобилизацию проводили при перемешивании смеси на магнитной мешалке при 200 об./мин с соблюдением следую-

щих температурных режимов — 24, 37, 45 и 50°C. Время инкубации антигена с латексными микросферами — 1, 2, 3 и 4 ч.

Отмывку от несвязавшегося антигена осуществляли дважды 0,1 М фосфатно-солевым буферным р-ром путём центрифугирования при 6000 об./мин в течение 15 мин.

Осадок, содержащий латексные микросферы с иммобилизованным на их поверхности антигеном, ресуспендировали в 0,9% р-ре NaCl до рабочей концентрации диагностикума — 0,2%.

Наилучшие результаты были получены при соотношениях 2% р-ра латексных микросфер к антигену 1:3 и 1:4. Поскольку целесообразно исключить перерасход антигена, то выбрали вариант иммобилизации латекса антигеном в соотношении 1:3. Максимальное связывание библиганда с носителем происходило при температуре 45°C и времени инкубации 3 ч.

Аналитическая чувствительность полученного диагностикума составила не менее 1:2560. Наблюдалась перекрёстная реакция только с одной из трёх гетерологических сывороток — сывороткой диагностической туляремийной до ¼ её титра.

Для исключения проявления неспецифичных реакций с гетерологичной туляремийной сывороткой был проведён ряд экспериментов по блокировке свободных центров латексных микросфер. Использовали желатин в концентрации 0,1–1%, БСА — 0,1–0,2% и казеин — 0,05%.

Наилучший результат был достигнут с использованием при блокировке препарата 0,5% р-ром желатина с последующим разведением диагностикума до рабочей концен-

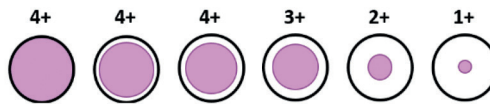


Рис. Распределение диагностикума на поверхности дна лунок планшета в зависимости от степени агглютинации.

Fig. Distribution of the diagnosticum over the bottom surface of wells depending on the agglutination degree.

трации в 0,1% р-ре желатина. Препараты с казеином не подлежат длительному хранению из-за микробного пророста, а также отмечено негативное влияние казеина на аналитическую чувствительность экспериментальных серий. Кроме того, при использовании БСА не сформировался отрицательный контроль.

Всего было проанализировано 5 серий препарата, изготовленных по отработанной вышеописанной технологии. Аналитическая чувствительность диагностикума составила 1:2560–1:5120 при полной специфичности. Данные по аналитической характеристике двух серий (в трёх повторах) представлены в таблице.

С использованием четырёхпольных таблиц проводилась оценка эффективности препарата по следующим показателям: чувствительность (Se), специфичность (Sp), диагностическая эффективность (De), отношение правдоподобия положительного результата (LR+) и отношение правдоподобия отрицательного результата (LR-).

При оценке диагностической специфичности диагностикума исследовали в РАЛ

30 сывороток крови людей, не болевших ранее бруцеллёзом и не вакцинированных против него, и получили положительные результаты в трёх сыворотках. Для подтверждения положительных результатов были проведены дополнительные исследования по методам Хеддельсона, Райта и ИФА. В результате проверки двух сывороток крови с титром в РАЛ 1:40 антитела не были выявлены. Методом ИФА в третьей пробе с титром в РАЛ 1:160 обнаружены иммуноглобулины против бруцеллёза (коэффициент позитивности (КП) IgA — 3,95; КП IgG — 1), но два других метода дали отрицательный результат. Таким образом, согласно проведённым исследованиям, диагностическая специфичность экспериментального препарата составила 93,33% (95% доверительный интервал (95% ДИ): 77,93–99,18%).

Диагностическую чувствительность проверяли на 20 сыворотках крови людей, серопозитивных к возбудителю бруцеллёза. В четырёх сыворотках выявлены антитела в титре 1:20, что ниже диагностического титра. Чувствительность РАЛ составила

Таблица. Аналитические характеристики латексного диагностикума
Table. Analytical characteristics of the developed latex diagnosticum

Сыворотки диагностические	Серия 3			Серия 5		
	1	2	3	1	2	3
<i>Аналитическая чувствительность</i>						
Сыворотка диагностическая поливалентная бруцеллёзная сухая для РА	1:2560 (4+)	1:2560 (4+)	1:2560 (3+)	1:2560 (4+)	1:2560 (3+)	1:2560 (4+)
Сыворотка агглютинирующая бруцеллёзная для РА	1:5120 (3+)	1:5120 (3+)	1:2560 (4+)	1:5120 (3+)	1:2560 (4+)	1:5120 (3+)
<i>Аналитическая специфичность</i>						
Сыворотка диагностическая холерная О1 адсорбированная сухая для РА	Отсутствует реакция в РАЛ					
Сыворотка диагностическая сальмонеллёзная адсорбированная О-поливалентная для РА						
Сыворотка диагностическая туляремиальная сухая для РА						

80% (95% ДИ: 56,34–94,27%) в сравнении с результатами ИФА, но при этом более чувствительна, чем реакция Райта, которая позволила выявить антитела только в 50% от общего количества исследуемых сывороток.

Диагностическая эффективность сконструированного латексного диагностикума, которая показывает долю правильных результатов теста среди всех обследованных, составляет 88% (95% ДИ: 75,69–95,47%).

Отношение правдоподобия положительного результата (LR+) составило 12. То есть, вероятность получения истинно положительного результата теста выше вероятности получения ложноположительного результата в 12 раз.

Отношение правдоподобия отрицательного результата (LR-) для нашего экспериментального диагностического препарата — 0,21. То есть, вероятность получения ложноотрицательного результата теста меньше вероятности получения истинно отрицательного результата почти в 5 раз.

Также при статистической обработке данных выявлена высокая степень тесноты корреляции ($r=0,729$) значений титров, полученных при использовании реакции Райта и РАЛ. Между значениями титров антител в РАЛ и величинами КП специфических иммуноглобулинов в ИФА установлены следующие связи: $r=0,782$ — с КП IgM; $r=0,596$ — с КП IgA; $r=0,192$ — с КП IgG.

Таким образом, согласно таблице Чеддока, вышеуказанные коэффициенты корреляции Пирсона свидетельствуют о высокой прямо пропорциональной корреляционной связи между результатами РАЛ, реакции Райта и ИФА (для определения IgM), что свидетельствует о получении близких по значимости результатов при выявлении противобруцеллёзных антител в сыворотке крови человека.

Выводы

В ходе проведённых исследований разработана биотехнология получения диагностикума латексного бруцеллёзного антигенного на основе полиакролеиновых микросфер.

Отработаны оптимальные условия иммобилизации лиганда на поверхности полиакролеиновых латексных микросфер, а также подобрана концентрация сенсibilизирующего антигена (сенсibilизация латекса антигеном в соотношении 1:3 при температуре 45°C в течение 3 ч с последующей блокировкой активных центров 0,5% желатином).

Аналитическая чувствительность диагностикума составила не менее 1:2560, при отсутствии перекрёстных реакций с гетерологичными сыворотками. Контроль диагностических характеристик экспериментальных серий показал их чувствительность — 80%, специфичность — 93,33%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Зайцев А.А. *Способ получения диагностикума суспензионного чумного антигенного на основе фракции I*. Патент РФ № 2199750, 2003. [Zajtsev A.A. *Sposob polucheniya diagnostikuma suspenszionnogo chumnogo antigennogo na osnove fraktsii I* [Method for producing pest antigen suspension diagnosticum on the basis of fraction I]. Patent RF No. 2199750, 2003. (In Russian)].
2. Кедик С.А., Грицкова И.А., Прокопов Н.И., Станишевский Я.М., Панов А.В., Суслов В.В., Петрова Е.А. Высокочувствительные тест-системы на основе конъюгатов «полимерная микросфера — биолиганд» для экспресс-диагностики протозонозных заболеваний. *Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова*. 2013;8(4):3–10. [Kedik S.A., Gritskova I.A., Prokopov N.I., Stanishevsky Ya.M., Panov A.V., Suslov V.V., Petrova E.A. Vysokochuvstvitel'nyye test-sistemy na osnove kon'yugatov «polimernaya mikrosfera — bioligand» dlya ekspress-diagnostiki proteinopatii [High-sensitivity test systems based on conjugates “polymer microspheres — bioligands” for rapid proteinopathy diagnostics]. *Vestnik MITKhT im. M.V. Lomonosova* [Journal of the Moscow State University of Fine Chemical Technologies named after M.V. Lomonosov]. 2013;8(4):3–10. (In Russian)].

3. Кожушный А.П., Кохановская Н.А., Третьяков О.Ю., Баженов А.И., Коноплева М.В., Суслов А.П. Продукция цитокинов в ранних антигенстимулированных клеточных реакциях при вирусной инфекции. *Медицинская иммунология*. 2011;13(4–5):389–391. [Kozhushny A.P., Kokhanovskaya N.A., Tretyakov O.Yu., Bazhenov A.I., Konopleva M.V., Suslov A.P. Produktsiya tsitokinov v rannikh antigenstimulirovannykh kletochnykh reaktsiyakh pri virusnoy infektsii [Cytokine production in early antigen-stimulated cellular responses during viral infection]. *Meditsinskaya immunologiya [Medical Immunology (Russia)]*. 2011;13(4–5):389–391. (In Russian)]. DOI: 10.15789/1563-0625-2011-4-5-378-415
4. Куделина А.М., Новицкая И.В., Прохвятилова Е.В. Конструирование диагностикума для выявления возбудителей мелиоидоза в реакции латекс-агглютинации. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014;25:139–141. [Kudelina A.M., Novitskaya I.V., Prokhvatilova E.V. Konstruirovaniye diagnostikuma dlya vyyavleniya vzbuditeley melioidoza v reaktcii lateks-agglutinatsii [Development of diagnosticum for the detection of melioidosis agents in latex agglutination reaction]. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii [Far Eastern Journal of Infectious Pathology]*. 2014;25:139–141. (In Russian)].
5. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Пономаренко Д.Г., Манин Е.А., Ковалёв Д.А., Русанова Д.В., Саркисян Н.С., Таран Т.В., Ракитина Е.Л., Осина Н.А., Касьян Ж.А., Касьян И.А., Щербаква С.А., Кулаков Ю.К., Михайлова В.В., Ляпина Е.П., Шульдяков А.А., Левин Д.Ю. Бруцеллёз. *Современное состояние проблемы*. Ставрополь: ООО «Губерния», 2019. [Onishchenko G.G., Kulichenko A.N., Maletskaaya O.V., Ponomarenko D.G., Manin E.A., Kovalev D.A., Rusanova D.V., Sarkisyan N.S., Taran T.V., Rakitina E.L., Osina N.A., Kasyan Zh.A., Kasyan I.A., Shcherbakova S.A., Kulakov Yu.K., Mikhailova V.V., Lyapina E.P., Shuldyakov A.A., Levin D.Yu. Brutsellez. *Sovremennoe sostoyanie problemy [Brucellosis. Current state of the problem]*. Stavropol: OOO "Guberniya" Publ., 2019. (In Russian)].
6. Пономаренко Д.Г., Хачатурова А.А., Ковалёв Д.А., Скударева О.Н., Лукашевич Д.Е., Жаринова И.В., Даурова А.В., Германова А.Н., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Кузнецова И.В., Шапаков Н.А., Бобрышева О.В., Писаренко С.В., Манин Е.А., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Анализ заболеваемости бруцеллёзом и молекулярно-генетическая характеристика популяции бруцелл на территории Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;2:61–74. [Ponomarenko D.G., Khachaturova A.A., Kovalev D.A., Skudareva O.N., Lukashevich D.E., Zharinova I.V., Daurova A.V., Germanova A.N., Logvinenko O.V., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Kuznetsova I.V., Shapakov N.A., Bobrysheva O.V., Pisarenko S.V., Manin E.A., Maletskaaya O.V., Kulichenko A.N. Analiz zaboлеваemosti brutsellezom i molekulyarno-geneticheskaya kharakteristika populyatsiya kharakteristika brucella population in the territory of the Russian Federation]. *Problemy osobo opasnykh infektsiy [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023;2:61–74. (In Russian)]. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-61-74
7. Симакова Д.И., Карбышев Г.Л., Ларионова Л.В., Терентьев А.Н., Лысова Л.К., Наркевич А.Н., Кочеткова А.П., Самаянц Е.М. Псевдотуберкулезный видоспецифический антигенный полимерный диагностикум. Принципы конструирования и результаты испытания. *Биотехнология*. 2011;3:88–95. [Simakova D.I., Karbyshev G.L., Larionova L.V., Terentiev A.N., Lysova L.K., Narkevich A.N., Kochetkova A.P., Sanamyants E.M. Psevdotuberkuleznyy vidospetsificheskyy antigennyy polimernyy diagnostikum. Printsipy konstruirovaniya i rezul'taty ispytaniya [A pseudotuberculosis species-specific antigenic polymeric diagnosticum. Principles of designing and results of testing]. *Biotechnologiya [Biotechnology in Russia]*. 2011;3:88–95. (In Russian)].
8. Фролов Д.М., Сенина Т.В., Замарина Т.В., Храпова Н.П. Использование реакции латекс-агглютинации в ускоренном определении патогенных Буркхольдерий. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019;3:106–110. [Frolov D.M., Senina T.V., Zamarina T.V., Khrapova N.P. Ispol'zovanie reaktcii lateks-agglutinatsii v uskorennom opredelenii patogennykh Burkholderiy [Application of latex-agglutination for rapid detection of pathogenic Burkholderia]. *Problemy osobo opasnykh infektsiy [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019;3:106–110. (In Russian)]. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-106-110
9. El-Sayed A., Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2018;6(Suppl):S31–S35. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008
10. Greenhalgh T. How to read a paper: *The basics of evidence-based medicine and health care*. Hoboken: John Wiley & Sons Ltd, 2019.
11. Pereira C.R., Cotrim de Almeida J.V.F., Cardoso de Oliveira I.R., Faria de Oliveira L., Pereira L.J., Zangerônimo M.G., Lage A.P., Dorneles E.M.S. Occupational exposure to Brucella spp.: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2020;14(5):e0008164. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008164

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Курноскина Мария Михайловна*, ФКУЗ
Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора;
e-mail: kurnoskina_mariya@mail.ru

Mariya M. Kurnoskina*, Stavropol Research
Anti-Plague Institute of the Federal Service
for Supervision of Consumer Rights Protection
and Human Wellbeing of Russia;
e-mail: kurnoskina_mariya@mail.ru

Жарникова Ирина Викторовна, д.б.н., ФКУЗ
Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора;
e-mail: jarnikova_iv@snipchi.ru

Irina V. Zharnikova, Dr. Sci. (Biol.), Stavropol
Research Anti-Plague Institute of the Federal
Service for Supervision of Consumer Rights
Protection and Human Wellbeing of Russia;
e-mail: jarnikova_iv@snipchi.ru

Русанова Диана Владимировна, к.м.н., ФКУЗ
Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора;
e-mail: rusanova_dv@snipchi.ru

Diana V. Rusanova, Cand. Sci. (Med.), Stavropol
Research Anti-Plague Institute of the Federal
Service for Supervision of Consumer Rights
Protection and Human Wellbeing of Russia;
e-mail: rusanova_dv@snipchi.ru

Кошкидько Александра Геннадьевна, к.б.н.,
ФКУЗ Ставропольский противочумный инсти-
тут Роспотребнадзора;
e-mail: koshkidko_ag@snipchi.ru

Aleksandra G. Koshkidko, Cand. Sci. (Biol.),
Stavropol Research Anti-Plague Institute of the Fe-
deral Service for Supervision of Consumer Rights
Protection and Human Wellbeing of Russia;
e-mail: koshkidko_ag@snipchi.ru

Жданова Елена Владимировна, к.б.н., ФКУЗ
Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора;
e-mail: jdanova_ev@snipchi.ru

Elena V. Zhdanova, Cand. Sci. (Biol.), Stavropol
Research Anti-Plague Institute of the Federal
Service for Supervision of Consumer Rights
Protection and Human Wellbeing of Russia;
e-mail: jdanova_ev@snipchi.ru

Пономаренко Дмитрий Григорьевич, к.б.н.,
ФКУЗ Ставропольский противочумный инсти-
тут Роспотребнадзора;
e-mail: ponomarenko_dg@snipchi.ru

Dmitriy G. Ponomarenko, Cand. Sci. (Biol.),
Stavropol Research Anti-Plague Institute of the Fe-
deral Service for Supervision of Consumer Rights
Protection and Human Wellbeing of Russia;
e-mail: ponomarenko_dg@snipchi.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ЦИТОСТАТИКАМ НА ПРИМЕРЕ КУЛЬТУР НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЁГКОГО *IN VITRO*

К.А. Макавеева*, Е.Г. Киркина, Д.С. Гайдай

АО «НПО «Дом фармации»
188663, Российская Федерация, Ленинградская обл., Всеволожский р-н,
г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, 3, корп. 245

Химиорезистентность является главным ограничивающим фактором применения противоопухолевых препаратов в лечении немелкоклеточного рака лёгкого. Данные по чувствительности опухолевых клеток *in vitro* к назначаемым цитостатическим препаратам могут позволить спрогнозировать химиорезистентность клеток и выбрать оптимальные лекарственные средства, нацеленные на регрессию заболевания и снижение опухолевого роста. Принимая во внимание тот факт, что методы оценки чувствительности клеток зависят от их метаболической активности, мы провели предварительный эксперимент для оценки пролиферативной активности клеток, что позволило подобрать концентрацию клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста и провести калибровку метода для клеточных культур.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак лёгкого, клеточные линии, чувствительность, химиорезистентность, *in vitro*

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Макавеева К.А., Киркина Е.Г., Гайдай Д.С. Определение чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам на примере культур немелкоклеточного рака лёгкого *in vitro*. *Биомедицина*. 2024;20(4):27–36. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-27-36>

Поступила 18.01.2024

Принята после доработки 13.05.2024

Опубликована 10.12.2024

DETERMINATION OF TUMOR CELL SENSITIVITY TO CYTOSTATIC AGENTS ON THE EXAMPLE OF CULTURES OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER *IN VITRO*

Kseniya A. Makaveeva*, Ekaterina G. Kirkina, Dmitriy S. Gaidai

Scientific and Production Association «Home of Pharmacy»
188663, Russian Federation, Leningrad Region, Vsevolozhsk District,
Kuzmolovsky Village, Zavodskaya Str., 3, building 245

Chemoresistance is a key factor restricting the use of anticancer drugs in the treatment of non-small cell lung cancer. Data on the sensitivity of tumor cells *in vitro* to prescribed cytostatic drugs can facilitate the prediction of cell chemoresistance for selecting optimal drugs aimed at curbing the disease and suppressing tumor growth. It is known that methods for assessing the sensitivity of cells depend on their metabolic activity. In view of this, we conducted a preliminary experiment to assess the proliferative activity of cells, which allowed us to select the concentration of cells in the exponential growth phase and calibrate the method for cell cultures.

Keywords: non-small cell lung cancer, cell lines, sensitivity, chemoresistance, *in vitro*

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

For citation: Makaveeva K.A., Kirkina E.G., Gaidai D.S. Determination of Tumor Cell Sensitivity to Cytostatic Agents on the Example of Cultures of Non-Small Cell Lung Cancer *in vitro*. *Journal Biomed.* 2024;20(4):27–36. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-27-36>

Submitted 18.01.2024

Revised 13.05.2024

Published 10.12.2024

Введение

Применение лекарственных препаратов в лечении немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ) имеет ограничения, связанные с приобретением клетками опухоли лекарственной устойчивости, проявляющейся прогрессией или рецидивом заболевания [3]. Феномен химиорезистентности является важнейшим ограничением системной химиотерапии рака лёгкого и обусловлен высоким уровнем экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости, которые определяют около 75–85% случаев низкой эффективности химиотерапии [1].

В связи с этим крайне важно тестировать препараты с использованием методов *in vitro* на выявление химиорезистентности/чувствительности клеток к ним путём проведения скрининга их метаболической или пролиферативной активности для более релевантного выбора схемы лечения в дальнейшем.

Актуальность исследования скрининга активности цитостатических препаратов состоит в предварительном анализе пролиферативного потенциала клеток и калибровке используемого метода измерения цитотоксичности для каждой клеточной линии. Конвертация показателей, полученных с помощью основных методов измерения цитотоксичности (например, МТТ-теста, резазурина-теста, ЛДГ-теста), сильно зависит от метаболической активности клеток. Научной новизной исследования является использование подхода, учитывающего индивидуальные способности клеток, заключающиеся в их пролиферативной активности.

В проведённом исследовании была изучена чувствительность клеток к воздействию

препаратов с помощью МТТ-теста, с предварительной оценкой пролиферативной активности клеток НМРЛ для нахождения экспоненциальной фазы роста клеток, где был также определён линейный диапазон с максимумом поглощения длины волны, свидетельствующий о максимальной метаболической активности клеток. Изучение пролиферативной активности клеток позволяет учитывать особенности роста клеток, используемых в качестве тест-системы *in vitro* для скрининга противоопухолевых препаратов, и может способствовать более точному измерению плотности клеток для определения их чувствительности к препаратам.

Данное исследование носит практический характер, предполагает апробацию подхода к определению чувствительности клеток, заключающегося в предварительной оценке пролиферативной активности клеток, подбора их оптимальной плотности и проведения калибровки метода измерения.

Цель работы — апробация подхода к определению чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам на примере культур немелкоклеточного рака лёгкого *in vitro* с предварительной оценкой их пролиферативной активности.

Материалы и методы

Резистентность опухолевых клеток может быть спрогнозирована с помощью методов измерения цитотоксичности, позволяющих оценить степень токсического воздействия лекарственного средства на пролиферацию клеток и их жизнеспособность на основа-

нии получения полумаксимальных эффективных концентраций (IC_{50}), вызывающих 50% ингибирование клеточной пролиферации. Чувствительными к воздействию препарата считаются клетки, большинство из которых теряют свои пролиферативные свойства и нежизнеспособны, тогда как резистентными считаются клетки, которые сохраняют жизнеспособность в присутствии лекарственного средства [2].

В данном исследовании использовали колориметрический анализ с помощью МТТ-теста, который позволяет оценивать интенсивность пролиферации на показатель метаболической активности клеток.

В основе теста лежит реакция превращения бледно-жёлтого красителя — 3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5 дифенилтетразолия бромида (МТТ) — в формазан фиолетового цвета под действием фермента сукцинатдегидрогеназы [4].

По результатам МТТ-теста вычисляли значения полумаксимальных эффективных концентраций (IC_{50}).

Исследуемый объект

Объектом исследования являлся лекарственный препарат Цисплатин-Тева (МНН: Цисплатин, «Teva Pharmaceutical Industries Ltd.», Нидерланды) в виде р-ра с концентрацией 0,5 мг/мл, Этопозид-Тева (МНН: Этопозид, «Teva Pharmaceutical Industries Ltd.», Нидерланды) в виде р-ра с концентрацией 20 мг/мл, Паклитаксел-Тева (МНН: Паклитаксел, «Teva Pharmaceutical Industries Ltd.», Нидерланды) в виде р-ра с концентрацией 6 мг/мл.

В качестве вещества позитивного контроля использовали 10% р-р додецилсульфата натрия. Выбор вещества позитивного контроля обусловлен известными цитотоксическими свойствами, которые реализуются за счёт лизиса клеток монослоя путём реализации неселективного механизма действия катионных поверхностно-активных веществ.

Также использовали отрицательный контроль, представляющий собой носитель,

питательную среду DMEM, с содержанием 10% FBS и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина.

Клеточные линии

В эксперименте использовали клеточные линии немелкоклеточного рака лёгкого, полученные от разных доноров, различающиеся по типу гистологических форм НМРЛ. Клеточная линия A549 (ООО «Биолот», Россия) выделена из аденокарциномы лёгкого и охарактеризована как репрезентативная клеточная линия для пневмоцитов альвеолярного II типа лёгких человека. Клеточная линия NCI-H1975 выделена из аденокарциномы лёгких («АТСС», Американская коллекция типовых клеточных культур). Клеточная линия NCI-H1299 выделена из метастазов в лимфатическом узле и представлена как многоклеточный подтип карциномы («АТСС», Американская коллекция типовых клеточных культур). Клеточная линия NCI-H460 выделена из плеврального выпота и по типу гистологической формы является крупноклеточным раком лёгкого («АТСС», Американская коллекция типовых клеточных культур).

Клеточные линии культивировали согласно стандартным условиям культивирования в полной среде DMEM в CO_2 -инкубаторе в условиях 5% CO_2 и 37°C.

МТТ-тест

Оценка пролиферативной активности клеток

Для проведения эксперимента каждую клеточную линию рассевали в лунки 96-луночного планшета в количестве 100, 80, 60, 40, 20 и 10% монослоя и холостой пробы. 100% монослой получали в результате произведения количества диссоциированных и жизнеспособных клеток/см² культурального 75-см² флакона и площади лунки 96-луночного планшета, составляющей 0,32 см². 80%–10% монослой клеток готовили как разведения, представляющие собой 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 и 0,1 объёма от изначально-го объёма суспензии.

Клетки высевали в культуральные 96-луночные плоскодонные планшеты (для каждой клеточной культуры — один планшет) путём внесения 100 мкл полученной суспензии.

Пролиферативную активность клеток оценивали через 4, 24, 48 и 72 ч после посева на лунки планшета в каждой концентрации клеток.

По истечении инкубации клеток из лунок удаляли супернатант и вносили 100 мкл р-ра МТТ, приготовленного в полной среде с концентрацией 0,5 мг/мл. По завершении инкубации с красителем, через 2 ч, вносили по 100 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана. Измерение проводили с помощью микропланшетного спектрофотометра xMARK («Bio-Rad», США) при длине волны поглощения 450 нм за вычетом фонового поглощения при 650 нм. После полученных результатов с учётом вычета холостой пробы был вычислен процент ингибирования по следующей формуле (2):

$$I_{\text{инг}} = \frac{OD_{\text{отрк}} - OD_{\text{эксп}}}{OD_{\text{отрк}}} \times 100\% \quad (2),$$

где $I_{\text{инг}}$ — индекс ингибирования; $OD_{\text{отрк}}$ — значение оптической плотности отрицательного контроля; $OD_{\text{эксп}}$ — значение оптической плотности в экспериментальной лунке.

Значения IC_{50} рассчитывали с помощью лицензионного программного обеспечения Prism 9.1.1 («GraphPad Software», США), с построением кривой, соответствующей сигмоидальной модели доза-реакция.

Статистический анализ

Для всех данных применялась описательная статистика: данные были проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро—Уилка. Межгрупповые различия анализировали параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. Для оценки данных с признаками нормального распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), с последующим межгрупповым сравнением с использованием критерия Даннета.

Различия определяли при уровне значимости $p < 0,05$. Статистический анализ выполняли с помощью лицензионного программного обеспечения Prism 9.1.1 («GraphPad Software», США).

$$ЖК(\%) = \frac{OD_{\text{эксп}} - OD_{\text{хп}}}{OD_{\text{пол.к}} - OD_{\text{хп}}} \times 100\% \quad (1),$$

где ЖК — процент жизнеспособных клеток; $OD_{\text{эксп}}$ — оптическая плотность в экспериментальной лунке планшета; $OD_{\text{хп}}$ — оптическая плотность в лунке холостой пробы, где концентрация клеток 0%; $OD_{\text{пол.к}}$ — оптическая плотность в лунке положительно-го контроля, где концентрация клеток 100%.

Определение чувствительности клеток к препаратам

Для проведения эксперимента каждую клеточную линию рассеивали в лунки 96-луночного планшета в количестве клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста: А549 — 11,5 тыс. кл./лунку, NCI-H1975 — 10,8 тыс. кл./лунку, NCI-H1299 — 28,2 тыс. кл./лунку, NCI-H460 — 23,0 тыс. кл./лунку в объёме 100 мкл полной среды. По истечении 24 ч вносили разведения тестируемых объектов в концентрациях 1 мМ, 100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, 0,1 мкМ, 0,01 мкМ и 0,001 мкМ. Время инкубации клеток с препаратами составляло 24 ч и было обусловлено временем периода по-

Результаты исследований

Оценка пролиферативной активности клеток

Для всех клеточных линий в лунках, представляющих собой процент клеточного монослоя выше 0 (от 10 до 100%), была выявлена активность ферментативных систем сукцинатдегидрогеназы, что свидетельствует в первую очередь об их жизнеспособности. Оптическая плотность находилась в прямой зависимости от количества клеток в лунке планшета.

На рисунке у всех клеточных линий при 48-часовой инкубации оптическая плотность клеток в концентрациях 10–80% имела статистически достоверные различия от значений при 100%. Клеточная линия

NCI-H1299 (А) при 24-часовой инкубации в диапазоне концентраций 10–80% показала статистически значимые отличия от концентрации 100% (табл. 1). При 24-часовой инкубации у клеточной линии NCI-H460 (Б) в диапазоне концентраций 10–60% были обнаружены статистически значимые отличия от концентрации 100% (табл. 2). При 24-часовой инкубации у клеточной линии NCI-H1975 (В) в диапазоне концентраций 10–80% обнаружены статистически значимые отличия от концентрации 100% (табл. 3). У клеточной линии А549 (Г) при 24-часовой инкубации в диапазоне концентраций 10–60% обнаружены статистически значимые отличия от концентрации 100% (табл. 4).

Таблица 1. Зависимость оптической плотности содержимого лунок клеточной линии NCI-H1299 от времени инкубации и концентрации клеток в лунке планшета, $M [SD]$, $n=6$

Table 1. Dependence between the optical density of the well contents of the NCI-H1299 cell line and the incubation time and concentration of cells in a well, $M [SD]$, $n=6$

Концентрация		M±SD	Время инкубации			
% монослоя	Количество клеток в лунке		4 ч	24 ч	48 ч	72 ч
100	35200	M	0,31 ^{ab}	0,31 ^{ab}	0,61 ^b	0,62 ^a
		SD	0,02	0,02	0,03	0,03
80	28160	M	0,19 ^{ab}	0,19 ^{ab}	0,46 ^{ab}	0,59 ^a
		SD	0,02	0,02	0,01	0,09
60	21120	M	0,16 ^{ab}	0,16 ^{ab}	0,43 ^{ab}	0,52 ^{ab}
		SD	0,01	0,01	0,02	0,04
40	14080	M	0,12 ^{ab}	0,12 ^{ab}	0,33 ^{ab}	0,50 ^{ab}
		SD	0,01	0,01	0,02	0,04
20	7040	M	0,07 ^{ab}	0,07 ^{ab}	0,19 ^{ab}	0,38 ^{ab}
		SD	0,01	0,01	0,02	0,02
10	3520	M	0,04 ^{ab}	0,04 ^{ab}	0,15 ^{ab}	0,26 ^{ab}
		SD	0,02	0,02	0,01	0,01
0	0	M	-2,3×10 ^{-6b}	-2,3×10 ^{-6b}	-2,3×10 ^{-6b}	-1,8×10 ^{-6b}
		SD	0,01	0,01	0,01	0,00

Примечания (здесь и далее): ^a — ANOVA, *post-hoc* критерий Даннета, отличия статистически значимы в сравнении с отрицательным контролем (холостая проба) при $p<0,05$; ^b — ANOVA, *post-hoc* критерий Даннета, отличия статистически значимы в сравнении с положительным контролем (100% клеточного монослоя) при $p<0,05$.

Notes (hereinafter): ^a — ANOVA, Dunnett's *post-hoc* test, differences are statistically significant compared to the negative control (blank sample) at $p<0.05$; ^b — ANOVA, Dunnett's *post-hoc* test, differences are statistically significant compared to the positive control (100% cell monolayer) at $p<0.05$.

Таблица 2. Зависимость оптической плотности содержимого лунок клеточной линии NCI-H460 от времени инкубации и концентрации клеток в лунке планшета, $M [SD]$, $n=6$
Table 2. Dependence between the optical density of the well contents of the NCI-H460 cell line and the incubation time and concentration of cells in a well, $M [SD]$, $n=6$

Концентрация		M±SD	Время инкубации			
% монослоя	Количество клеток в лунке		4 ч	24 ч	48 ч	72 ч
100	38400	M	0,30 ^a	0,39 ^a	0,44 ^a	0,31 ^a
		SD	0,03	0,019	0,02	0,13
80	30720	M	0,25 ^a	0,31 ^{ab}	0,46 ^a	0,41 ^a
		SD	0,04	0,02	0,02	0,07
60	23040	M	0,20 ^{ab}	0,18 ^{ab}	0,34 ^{ab}	0,44 ^a
		SD	0,04	0,01	0,05	0,05
40	15360	M	0,15 ^{ab}	0,16 ^{ab}	0,32 ^{ab}	0,38 ^a
		SD	0,03	0,02	0,04	0,15
20	7680	M	0,08 ^{ab}	0,11 ^{ab}	0,24 ^{ab}	0,35 ^a
		SD	0,03	0,01	0,01	0,09
10	3840	M	0,05 ^{ab}	0,06 ^{ab}	0,14 ^{ab}	0,2982 ^a
		SD	0,01	0,00	0,02	0,06
Холодная проба	0	M	1,3×10 ^{-6b}	0 ^b	0 ^b	0 ^b
		SD	0,01	0,00	0,01	0,02

Таблица 3. Зависимость оптической плотности содержимого лунок клеточной линии NCI-H1975 от времени инкубации и концентрации клеток в лунке планшета, $M [SD]$, $n=6$
Table 3. Dependence between the optical density of the well contents of the NCI-H1975 cell line and the incubation time and cell concentration in a well, $M [SD]$, $n=6$

Концентрация		M±SD	Время инкубации			
% монослоя	Количество клеток в лунке		4 ч	24 ч	48 ч	72 ч
100	18000	M	0,13 ^a	0,13 ^a	0,15 ^a	0,11 ^a
		SD	0,02	0,02	0,04	0,02
80	14400	M	0,10 ^{ab}	0,12 ^a	0,14 ^a	0,12 ^a
		SD	0,01	0,02	0,04	0,02
60	10800	M	0,08 ^{ab}	0,10 ^{ab}	0,14 ^a	0,12 ^a
		SD	0,01	0,01	0,01	0,02
40	7200	M	0,04 ^{ab}	0,07 ^{ab}	0,09 ^{ab}	0,08 ^{ab}
		SD	0,01	0,02	0,02	0,01
20	3600	M	0,02 ^b	0,03 ^{ab}	0,04 ^b	0,06 ^{ab}
		SD	0,01	0,01	0,02	0,02
10	1800	M	0,01 ^b	0,02	0,02 ^b	0,02 ^b
		SD	0,01	0,01 ^b	0,01	0,01
0	0	M	1,8×10 ^{-6b}	2,3×10 ^{-6b}	0,00 ^b	-2,3×10 ^{-6b}
		SD	0,00	0,01	0,01	0,01

Таблица 4. Зависимость оптической плотности содержимого лунок клеточной линии A549 от времени инкубации и концентрации клеток в лунке планшета, M [SD], n=6

Table 4. Dependence between the optical density of the well contents of the A549 cell line and the incubation time and cell concentration in a well, M [SD], n=6

Концентрация		M±SD	Время инкубации			
% монослоя	Количество клеток в лунке		4 ч	24 ч	48 ч	72 ч
100	19200	M	0,29 ^a	0,72 ^a	0,52 ^a	0,37 ^a
		SD	0,01	0,05	0,01	0,09
80	15200	M	0,26 ^{ab}	0,70 ^a	0,41 ^{ab}	0,35 ^a
		SD	0,03	0,03	0,11	0,02
60	11500	M	0,22 ^{ab}	0,54 ^{ab}	0,33 ^{ab}	0,32 ^a
		SD	0,02	0,04	0,03	0,02
40	7600	M	0,16 ^{ab}	0,40 ^{ab}	0,25 ^{ab}	0,23 ^{ab}
		SD	0,03	0,03	0,02	0,08
20	3840	M	0,09 ^{ab}	0,20 ^{ab}	0,14 ^{ab}	0,21 ^{ab}
		SD	0,02	0,02	0,02	0,08
10	1920	M	0,04 ^{ab}	0,12 ^{ab}	0,11 ^{ab}	0,17 ^{ab}
		SD	0,02 ^{ab}	0,03	0,01	0,01
0	0	M	1,3×10 ^{-6b}	2,3×10 ^{-6b}	-2,8×10 ^{-6b}	0,00
		SD	0,01	0,01	0,02	0,00

Определение чувствительности клеток к препаратам

Согласно полученным значениям IC₅₀, к цисплатину оказались чувствительны клетки аденокарциномы, NCI-H1975 и A549, причём из них обнаруживает наибольшую чувствительность клеточная линия NCI-H1975 (2,6 мкМ). Наименьшую чувствительность выявили у клеток крупноклеточного рака лёгкого, NCI-H460 и NCI-H1299, где NCI-H1299 обладает самым высоким значением полумаксимальной ингибирующей концентрации (118 мкМ), что свидетельствует о наибольшей резистентности.

К этопозиду значения полумаксимальных ингибирующих концентраций оказались самыми высокими, что свидетельствует о меньшей чувствительности клеток к этому препарату, при этом клеточные линии аденокарциномы проявляют большую чувствительность к препарату, чем клетки крупноклеточного рака лёгкого, среди которых наиболее резистентными оказались клетки NCI-H460 (715 мкМ).

К паклитакселу клетки обнаруживают наибольшую чувствительность, у всех клеточных линий значения полумаксимальных эффективных концентраций яв-

Таблица 5. Значения IC₅₀ известных цитостатических препаратов на клеточных линиях HMP/L

Table 5. IC₅₀ values of known cytostatic drugs on NSCLC cell lines

Препарат	Клеточные линии			
	NCI-H1299	NCI-H460	NCI-H1975	A549
IC ₅₀ (мкМ)				
Цисплатин	118	57	2,6	27
Этопозид	269	715	100	98
Паклитаксел	14,3	32	0,7	17

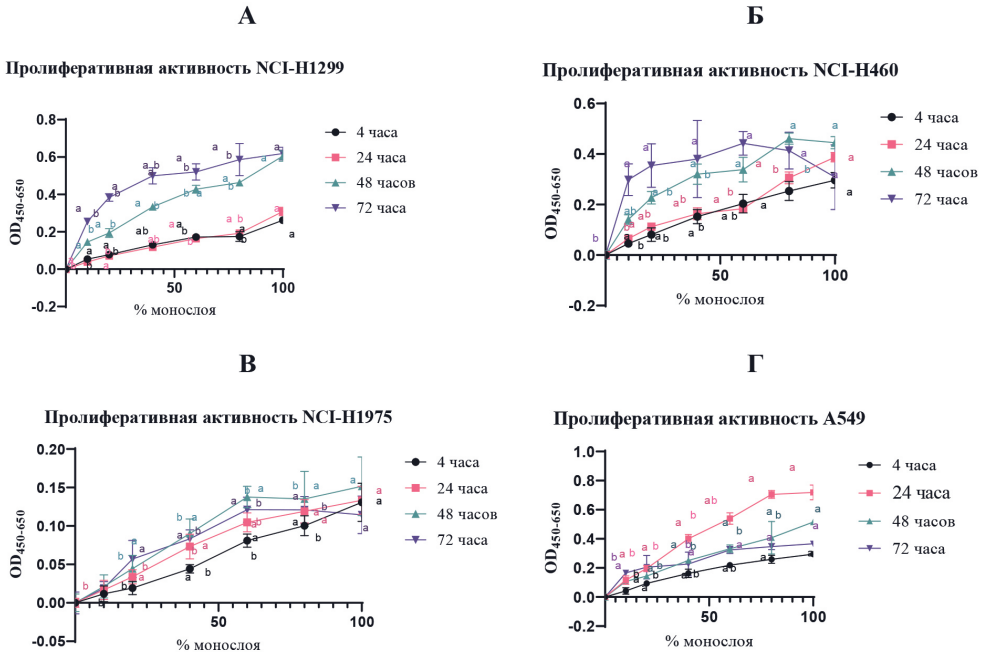


Рис. Результаты оценки пролиферативной активности клеток NCI-H1299 (А), NCI-H 460 (Б), NCI-H1975 (В), A549 (Г). Представлены $OD_{450-650}$ жизнеспособных клеток ($M \pm SD$, $n=6$).

Fig. Proliferative activity of NCI-H1299 (A), NCI-H 460 (Б), NCI-H1975 (В), and A549 (Г) cells. $OD_{450-650}$ of viable cells are presented ($M \pm SD$, $n=6$).

Примечание: а — ANOVA, post-hoc критерий Даннета, отличия статистически значимы в сравнении с отрицательным контролем (0% клеток) при $p < 0,05$; б — ANOVA, post-hoc критерий Даннета, отличия статистически значимы в сравнении с положительным контролем (100% клетки) при $p < 0,05$.

Note: а — ANOVA, Dunnett's post-hoc test, differences are statistically significant compared to the negative control (0% of cells) at $p < 0.05$; б — ANOVA, Dunnett's post-hoc test, differences are statistically significant compared to the positive control (100% of cells) at $p < 0.05$.

ляются низкими по сравнению со значениями, полученными для других препаратов. Наибольшую чувствительность по сравнению с другими клеточными линиями проявляет NCI-H1975 (0,7 мкМ). Меньшая чувствительность была выявлена у A549 (17 мкМ) и NCI-H1299 (14,3 мкМ), тогда как NCI-H460 обладало самым большим значением полумаксимальной эффективной концентрации (32 мкМ), что может говорить о наименьшей чувствительности к препарату. Результаты представлены в табл. 5.

Обсуждение результатов

Оценка пролиферативной активности клеток

Выбор оптимальной клеточной концентрации был обусловлен наличием максимальной пролиферативной активности клеток в лог-фазе роста культуры, но не достигающей до стадии плато, при наличии статистически значимых отличий относительно значений положительного контроля (100% клеточного моноосля, характерного для стадии плато) и холостой пробы (0% клеточного моноосля).

Для клеток линии NCI-H1299 выбрали 80% клеточного монослоя или 28160 клеток на лунку при 24-часовой инкубации. У клеточной линии NCI-H460 выбрали 60% клеточного монослоя или 23040 клеток на лунку при 24-часовой инкубации. Концентрация клеток линии NCI-H1975 составила 60% клеточного монослоя или 10800 клеток на лунку при 24-часовой инкубации. Концентрация клеток линии A549 составила 60% клеточного монослоя или 11500 клеток на лунку при 24-часовой инкубации.

Определение чувствительности клеток к препаратам

По полученным значениям IC_{50} можно заключить, что наиболее чувствительными к препаратам являются клеточные линии аденокарциномы немелкоклеточного рака лёгкого (NCI-H1975 и A549), тогда как крупноклеточный рак лёгкого проявляет резистентность ко всем препаратам (NCI-H460), однако клетки NCI-H1299 оказались чувствительны к воздействию паклитаксела. Согласно проведённому исследованию, паклитаксел оказывал цитотоксическое действие в концентрациях 1 мМ, 100 мкМ на все клеточные линии,

на NCI-H1975 также в концентрациях 10 мкМ и 1 мкМ. Этопозид, как и цисплатин, оказывал цитотоксическое действие только при 1000 мкМ на все клеточные линии. Однако в концентрации 100 мкМ цисплатин оказывал цитостатическое действие на все клеточные линии, тогда как этопозид — только на клетки аденокарциномы, что подтверждает то, что к паклитакселу клетки оказались наиболее чувствительны, тогда как к этопозиду — резистентны.

Заключение

Проведённое исследование позволило подобрать оптимальную концентрацию клеток НМРЛ *in vitro* и учесть их индивидуальные особенности для определения чувствительности к цитостатикам. Разные клеточные линии НМРЛ имеют такие индивидуальные характеристики, как плотность посева на лунку, морфологические особенности, скорость удвоения популяции и время выхода на лог-фазу роста.

Полученные результаты подтверждают успешную апробацию данного подхода к определению химиорезистентности клеток на примере тестирования известных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Боярских У.А., Кондрахин Ю.В., Евшин И.С., Шарипов Р.Н., Комельков А.В., Мусаткина Е.А., Чевкина Е.М., Сукоян М.А., Колпаков Ф.А., Кашкин К.Н., Филипенко М.Л. Прогнозирование чувствительности клеток немелкоклеточного рака лёгких к действию цисплатина и паклитаксела на основании уровня экспрессии маркерных генов. *Молекулярная биология*. 2011;45(4):652–661. [Boyarских U.A., Kondrakhin Yu.V., Evshin I.S., Sharipov R.N., Komelkov A.V., Musatkina E.A., Chevkina E.M., Sukoyan M.A., Kolpakov F.A., Kashkin K.N., Filipenko M.L. Prognostirovanie chuvstvitel'nosti kletok nemelkokletochnogo raka legkikh k deystviyu tsisplatina i paklitaksel na osnovanii urovnya ekspressii markernykh genov [Prediction of the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to the action of cisplatin and paclitaxel based on the level of expression of marker genes]. *Molekulyarnaya biologiya* [Molecular Biology]. 2011;45(4):652–661. (In Russian)].
2. Кузин К.А., Фетисов Т.И., Князев Р.И., Фомина Л.Я., Мехеда Л.В., Лесовая Е.А., Белицкий Г.А., Якубовская М.Г., Кирсанов К.И. Определение химиорезистентности клеток рака яичников *in vitro*. *Успехи молекулярной онкологии*. 2019;6(4):8–25. [Fomina L.Ya., Mekheda L.V., Lesovaya E.A., Belitsky G.A., Yakubovskaya M.G., Kirsanov K.I. Opredelenie khimiorезистентности kletok raka yaichnikov *in vitro* [Determination of chemoresistance of ovarian cancer cells *in vitro*] *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* [Advances in Molecular Oncology]. 2019;6(4):8–25. (In Russian)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-8-25
3. Миллер С., Родионов Е., Тузиков С., Ефтеев Л.А., Юмов Е.Л., Цыганов М.М., Литвяков Н.В., Фролова И.Г., Чердынцева Н.В., Величко С.А., Гольдберг А.В. Комбинированное лечение местнораспространённого немелкоклеточного рака лёгкого и молекулярные аспекты химиорезистентности. *Вопросы онкологии*. 2019;65(3):393–398. [Miller S.,

Rodionov E., Tuzikov S., Efteev L.A., Yumov E.L., Tsyganov M.M., Litvyakov N.V., Frolova I.G., Cherdyntseva N.V., Velichko S.A., Goldberg A.V. Kombinirovannoe lechenie mestnorasprostrannogo nemelkokletchnogo raka legkogo i molekulyarnye aspekty khimiorезистентности [Combined treatment of locally advanced non-small cell lung cancer and molecular as-

pects of chemoresistance]. *Voprosy onkologii [Problems in Oncology]*. 2019;65(3):393–398. (In Russian). DOI: 10.37469/0507-3758-2019-65-3-393-398

4. Präbst K., Engelhardt H., Ringgeler S., Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods Mol. Biol.* 2017;1601:1–17. DOI: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Макавецкая Ксения Александровна*, АО «НПО «Дом фармации»;
e-mail: makaveeva.ka@doclinika.ru

Kseniya A. Makaveeva*, Scientific and Production Association «Home of Pharmacy»;
e-mail: makaveeva.ka@doclinika.ru

Киркина Екатерина Геннадьевна, АО «НПО «Дом фармации»;
e-mail: kirkina.eg@doclinika.ru

Ekaterina G. Kirkina, Scientific and Production Association «Home of Pharmacy»;
e-mail: kirkina.eg@doclinika.ru

Гайдай Дмитрий Сергеевич, АО «НПО «Дом фармации»;
e-mail: gajdaj.ds@doclinika.ru

Dmitriy S. Gaidai, Scientific and Production Association «Home of Pharmacy»;
e-mail: gajdaj.ds@doclinika.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ НА СТРЕССИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У КРЫС

М.Ю. Раваева^{1,*}, И.В. Черетаев¹, Е.Н. Чуян¹, М.В. Нагорская¹,
П.А. Галенко-Ярошевский²

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

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

В работе исследовали влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ) на стрессиндуцированные изменения гематологических показателей у крыс. Показано, что изолированное действие стресс-факторов различной интенсивности существенно изменяет некоторые гематологические показатели самцов крыс, а их комбинированное применение с ЭМИ КВЧ модифицирует эффекты изолированного воздействия этих стресс-факторов. Так, в условиях гипокинетического стресса (ГК) относительно контроля увеличивалось количество эритроцитов (на 12,7%; $p < 0,05$), при оксидативном стрессе (ОКСС) снижался гематокрит (на 19,0%; $p < 0,001$), а при остром стрессе возрастала средняя концентрация гемоглобина в эритроците (на 22,6%; $p < 0,05$). Комбинированное воздействие стресс-факторов различной природы с ЭМИ КВЧ существенно изменяло эффекты, характерные для изолированного воздействия этих стресс-факторов. Так, гипокинетический стресс в сочетании с низкоинтенсивным электромагнитным излучением крайне высокой частоты (ГК-КВЧ) по сравнению с ГК снижали количество эритроцитов на 11,0% ($p < 0,05$) и уровень гемоглобина на 11,2% ($p < 0,001$), возвращая эти показатели к уровню контроля. Комбинированное воздействие ОКСС-КВЧ нивелировало эффект снижения гематокрита при ОКСС, но снижало средний объем эритроцита и повышало среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците на 24,3% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Уменьшалось количество лейкоцитов и лимфоцитов при ОКСС и ОКСС-КВЧ, при этом комбинация ОКСС с ЭМИ КВЧ ослабляла стрессорный повреждающий эффект ОКСС.

Ключевые слова: острый стресс, хронический гипокинетический стресс, оксидативный стресс, гематологические показатели, низкоинтенсивное электромагнитное излучение крайне высокой частоты

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

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

Для цитирования: Раваева М.Ю., Черетаев И.В., Чуян Е.Н., Нагорская М.В., Галенко-Ярошевский П.А. Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты на стрессиндуцированные изменения гематологических показателей у крыс. *Биомедицина*. 2024;20(4):37–47. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-37-47>

Поступила 08.10.2024

Принята после доработки 11.11.2024

Опубликована 10.12.2024

EFFECT OF LOW-INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION OF ULTRAHIGH FREQUENCY ON STRESS-INDUCED CHANGES IN HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF RATS

Marina Y. Ravaeva^{1,*}, Igor V. Cheretaev¹, Elena N. Chuyan¹, Mariya V. Nagorskaya¹, Pavel A. Galenko-Yaroshevskii²

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

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

This work investigated the effect of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency (EMR EHF) on stress-induced changes in hematological parameters in rats. The isolated action of stress factors of varying intensity was shown to significantly change a number of hematological parameters of male rats, while their combined action with EMR EHF modifies the effects of isolated stress factors. Thus, under the conditions of hypokinetic stress (HS) relative to the control, the number of erythrocytes increased by 12.7% ($p < 0.05$); under oxidative stress (OS), hematocrit values decreased by 19.0% ($p < 0.001$); and under acute stress, the mean concentration of hemoglobin in erythrocytes increased by 22.6% ($p < 0.05$). The effect of stress factors of various origins in combination with EMR EHF significantly changed the effects characteristic of isolated action of these stress factors. Thus, hypokinetic stress in combination with low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency (HS-EHF) compared to HS reduced the number of erythrocytes by 11.0% ($p < 0.05$) and the hemoglobin level by 11.2% ($p < 0.001$), restoring these indices to the control level. The combined effect of OS-EHF neutralized the effect of hematocrit reduction in OS, although reducing the mean corpuscular volume and increased the mean corpuscular hemoglobin concentration by 24.3% ($p < 0.001$) compared to the control. The number of leukocytes and lymphocytes decreased in OS and OS-EHF, while the combination of OS with EMR EHF weakened the stress-related damaging effect of OS.

Keywords: acute stress, chronic hypokinetic stress, oxidative stress, rats, hematological parameters, low-intensity electromagnetic radiation at extremely high frequency

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

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

For citation: Ravaeva M.Y., Cheretaev I.V., Chuyan E.N., Nagorskaya M.V., Galenko-Yaroshevskii P.A. Effect of Low-Intensity Electromagnetic Radiation of Ultrahigh Frequency on Stress-Induced Changes in Hematological Parameters of Rats. *Journal Biomed.* 2024;20(4):37–47. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-37-47>

Submitted 08.10.2024

Revised 11.11.2024

Published 10.12.2024

Введение

В настоящее время в литературе накоплены различные сведения о положительном влиянии низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ) на количество форменных элементов крови и связанные с ними показатели. Так, в работе [4] было установлено, что при-

менение низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ с частотой 42,19 Гц и длиной волны 7,1 мм — как с плотностью потока мощности 10 мВт/см², так и 0,002 мкВт/см² — ослабляет токсическое действие цитостатиков на гранулоцитарный и эритроидный ряды, т. к. наблюдалась меньшая степень снижения содержания лейкоцитов, гемо-

глубина, эритроцитов в периферической крови, общего числа миелокариоцитов и эритрокариоцитов в костном мозге животных, получавших КВЧ-воздействие, на 4-й день после введения противоопухолевых препаратов. Под влиянием миллиметровых волн стимулировались процессы регенерации красного ростка, для которого был характерен более длительный период восстановления, чем для гранулоцитарного ряда. Авторы данной работы сделали вывод, что ЭМИ КВЧ в условиях токсического повреждения оказывает антистрессорное действие, повышая неспецифическую резистентность организма.

В исследовании [7] показано, что применение 10-кратных сеансов КВЧ-терапии в комплексном лечении пациентов с хроническим генерализованным пародонтизом приводит к быстрому восстановлению показателей количественного состава популяций лимфоцитов в периферической крови. В данной работе в данной работе применяли аппарат «Явь-1» со следующими параметрами ЭМИ КВЧ: рабочая длина волны — 5,6 мм; девиация частоты — ± 150 МГц; выходная мощность — 22–25 мВт; плотность мощности на выходе рупора — 10 мВт/см². Каждый сеанс КВЧ-терапии проводился в течение 30 мин.

В экспериментах, описанных в работе [2], было продемонстрировано, что облучение низкой интенсивности способно уменьшать уровень агрегации тромбоцитов. В данной работе в качестве источника микроволнового излучения использовали генератор на основе диода Ганна с частотой в диапазоне от 32,9 до 39,6 ГГц (длина волны, соответственно, — от 9,1 до 7,6 мм) и мощностью излучения от 3 до 30 мВт. Излучение подводилось к исследуемому объекту с помощью волновода сечением 7,2×3,4 мм² с согласующими элементами. Эффект облучения проявлялся в снижении степени агрегации тромбоцитов по сравнению с контролем при добавлении индук-

тора агрегации — ристомидина, а также в уменьшении скорости агрегации тромбоцитов. Добавление этанола в среду тромбоцитов способствовало дальнейшему снижению контролируемых параметров. Авторы данного исследования связали механизм обнаруженного эффекта с усилением апоптоза клеток и предположили, что микроволновое облучение стимулирует увеличение скорости образования свободных радикалов в обогащённой тромбоцитами плазме и может регулировать агрегационную активность тромбоцитов.

Вместе с тем в изученной нами литературе практически отсутствуют сведения о действии низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ на гематологические показатели в условиях его комбинации со стрессорными воздействиями, а в отношении эритроцитарных гематологических показателей и индексов не удалось обнаружить данных об эффектах низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ.

Цель исследования — проанализировать эффекты воздействия низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ на стрессиндуцированные изменения гематологических показателей у крыс и сравнить с изолированным воздействием стресс-факторов различной природы и продолжительности.

Материалы и методы

Экспериментальная часть работы выполнена на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» кафедры физиологии человека и животных и биофизики Института биохимических технологий, экологии, фармации, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского».

Исследование проведено в соответствии с ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экс-

периментальных и иных научных целей, правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований.

Экспериментальные животные

Эксперимент проводился на 160 половозрелых крысах-самцах популяции линий Wistar массой 220–250 г («ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово», Ленинградская обл.), прошедших карантин не менее 14 дней. Животные содержались в условиях вивария с естественным свето-темновым циклом при температуре 18–22°C на подстилке на основе початков кукурузы (ООО «Зилубаг», Россия), свободным доступом к воде и полноценному гранулированному корму ЛБК-120 (ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», Россия). Исследование было выполнено в соответствии с «Правилами

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

Дизайн исследований

Для эксперимента были отобраны животные одинакового возраста, характеризующиеся средней двигательной активностью и низкой эмоциональностью в тесте «Открытое поле», которые составляют большинство в популяции. Такой отбор позволил сформировать однородные группы животных с одинаковыми конституционными особенностями, одинаково реагирующих на действие различных факторов.

Таблица 1. Последовательность воздействия стресс-факторов и ЭМИ КВЧ в различных группах
Table 1. Sequence of effects caused by stress factors and electromagnetic radiation of extremely high frequency in different groups

Группы	Сутки эксперимента									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
К	К	К	К	К	К	К	К	К	К	К
ОС										ОС
ГК	ГК	ГК	ГК	ГК	ГК	ГК	ГК	ГК	ГК	ГК
ОКСС	H ₂ O ₂									
КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ
ГК-КВЧ	ГК/КВЧ	ГК/КВЧ	ГК/КВЧ	ГК/КВЧ	ГК/КВЧ	ГК/КВЧ	ГК/КВЧ	ГК/КВЧ	ГК/КВЧ	ГК/КВЧ
ОС-КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ/ОС
ОКСС-КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	КВЧ	ОКСС/ КВЧ

Примечание: К — контроль; ОС — группа крыс, подвергавшихся острому стрессу; ГК — группа крыс, подвергавшихся хроническому гипокинетическому стрессу; ОКСС — группа крыс, подвергавшихся действию оксидативного стресса; КВЧ — группа крыс, подвергавшаяся действию электромагнитного излучения крайне высокой частоты; ГК-КВЧ — группа крыс, подвергавшихся комбинированному воздействию хронического гипокинетического стресса (ГК) и низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (КВЧ); ОС-КВЧ — комбинация воздействия острого стресса (ОС, на 10-е сут эксперимента) и превентивного 10-кратного низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (КВЧ); ОКСС-КВЧ — комбинация воздействия оксидативного стресса (ОКСС) и превентивного 10-кратного низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (КВЧ).

Note: K – control; OS – a group of rats exposed to acute stress; GK – a group of rats exposed to chronic hypokinetic stress; OKCC – a group of rats exposed to oxidative stress; KBЧ – a group of rats exposed to extremely high frequency electromagnetic radiation; GK-KBЧ – a group of rats exposed to the combined effects of chronic hypokinetic stress (GK) and low-intensity extremely high frequency electromagnetic radiation (KBЧ); OS-KBЧ – a combination of acute stress (OS, on day 10 of the experiment) and a preventive 10-fold low-intensity extremely high frequency electromagnetic radiation (KBЧ); OKCC-KBЧ – a combination of oxidative stress (OKCC) and a preventive ten-fold low-intensity extremely high frequency electromagnetic radiation (KBЧ).

После предварительного отбора животных разделили на 8 групп по 20 особей в каждой. Схема последовательности воздействия стресс-факторов и ЭМИ КВЧ в различных группах показана в табл. 1.

Интактные животные 1-й группы являлись биологическим контролем (К) и находились в течение 10 сут в обычных условиях вивария. Животные 2-й группы подвергались изолированному действию острого стресса (ОС) на 10-е сут. Животные 3-й группы подвергались действию хронического 10-суточного гипокинетического стресса (ГК). Животные 4-й группы подвергались на 10-е сут однократному воздействию оксидативного стресса (ОКСС), животные 5-й группы подвергались 10-кратному воздействию ЭМИ КВЧ. Животные 6-й группы подвергались одновременному действию хронического 10-суточного гипокинетического стресса и ЭМИ КВЧ (ГК+КВЧ), при этом КВЧ-воздействие осуществлялось 10-кратно комбинированно со стрессом. Животные 7-й группы подвергались 10-кратному превентивному ЭМИ КВЧ и действию острого стресса (на 10-е сут, ОС-КВЧ), а 8-й группы — превентивному 10-кратному воздействию ЭМИ КВЧ и действию оксидативного стресса (на 10-е сут, ОКСС-КВЧ).

Хронический стресс моделировали ограничением подвижности (гипокинезией, ГК), что достигалось помещением крыс в специальные кассеты из оргстекла (140×60×60 мм для каждой крысы), в которых они находились в течение 10 сут по 20 ч. В течение последующих 4 ч проводили экспериментальные исследования, кормление и уход за животными. Известно, что ограничение подвижности крыс в клетках-пеналах вызывает стрессовую реакцию, интенсивность которой зависит от степени «жесткости» ГК [5]. Полученная экспериментальная модель позволила создать одинаковую степень «жесткости» ГК для всех животных, что яв-

ляется необходимым условием для получения сопоставимых результатов.

Острую стресс-реакцию (ОС) индуцировали в модели теста «Вынужденное плавание» [15] в бассейне в течение 60 мин (уровень воды — 30 см, температура воды +20°C). За 24 ч до стрессорного воздействия животные всех групп были лишены пищи при свободном доступе к воде. Подробнее методика описана в работе [9].

Оксидативный стресс (острое повреждение сосудистого русла, ОКСС) у крыс индуцировали путём введения в хвостовую вену р-ра H₂O₂ 3% объёмом 0,2 мл. Контрольной группе животных вводился в хвостовую вену физ. р-р того же объёма.

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

Забор крови осуществляли на 10-е сут эксперимента, после проведения всех запланированных манипуляций и исследований из хвостовой вены. В пробах венозной крови испытуемых крыс на гематологическом анализаторе Mythic-18 («Orphee», Швейцария) определяли:

1) эритроцитарные показатели — количество эритроцитов, содержание гемоглобина (HGB), гематокрит (Ht), средний объём эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в одном эритроците (MCH), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC);

2) лейкоцитарные показатели — количество лейкоцитов (WBC) и их субпопуляций — лимфоцитов (LYM), моноцитов (MON), гранулоцитов (GRA);

3) тромбоцитарные показатели — количество тромбоцитов (PLT), средний объём тромбоцитов (MPV), тромбоцит (PCT). В данном приборе реализованы методы импедансного подсчёта частиц и адсорбционной спектрофотометрии.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета Graph Pad Prizm 9.0 («GraphPad Software», США). Поскольку распределение значений переменных не подчинялось закону нормального распределения, то оценку достоверности межгрупповых различий проводили непараметрическим критерием множественных

сравнений Данна. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона (25 и 75%).

Результаты и обсуждение

Эритроцитарные гематологические показатели и индексы самцов крыс при изолированном воздействии стресс-факторов различной природы и их комбинаций с ЭМИ КВЧ

Как показали результаты анализа эритроцитарных показателей и индексов венозной крови самцов крыс в контроле (табл. 2),

Таблица 2. Эритроцитарные гематологические показатели и индексы самцов крыс при изолированном воздействии стресс-факторов различной природы и их комбинаций с ЭМИ КВЧ

Table 2. Erythrocyte hematological parameters and indices of male rats under isolated exposure to stress factors of various origins and their combinations with electromagnetic radiation of extremely high frequency

Группа	Показатель					
	RBC, $10^{12}/л$	HGB, г/л	Ht, %	MCV, фл	MCHC, г/дл	MCH, пг
К (n=20)	7,80 (7,67; 8,13) 100,0%	129,5 (127,3; 135,8) 100,0%	42,90 (37,30; 51,40) 100,0%	56,55 (45,73; 67,13) 100,0%	29,60 (25,45; 35,93) 100,0%	16,55 (16,30; 17,58) 100,0%
КВЧ (n=20)	7,22 (6,97; 7,97) 92,5%	125,0 (123,0; 135,2) 96,5%	35,15 (33,98; 37,05) 81,9%*	46,48 (46,30; 67,13) 82,2%	36,15 (35,60; 36,48) 122,1*	16,95 (16,80; 17,70) 102,4%
ОС (n=20)	8,01 (7,75; 9,63) 102,7%	134,5 (124,8; 167,4) 103,9%	36,80 (34,45; 45,53) 85,8%	47,10 (44,78; 47,58) 83,3%	26,30 (36,03; 36,48) 122,6*	17,04 (16,18; 17,30) 103,0%
ГК (n=20)	8,79 (8,53; 8,99) 112,7%*	137,5 (135,3; 143,8) 106,2%	43,60 (42,13; 47,45) 101,6%	49,26 (48,40; 53,15) 87,1%	31,10 (29,40; 31,95) 105,1%	15,65 (15,33; 16,50) 94,6%
ОКСС (n=20)	6,39 (6,28; 7,64) 81,9%	115,3 (107,0; 127,8) 89,0%	34,74 (29,85; 38,40) 81,0%*	50,10 (47,03; 57,45) 88,6%	35,45 (31,93; 35,98) 119,8%	17,59 (16,73; 18,43) 102,7%
ОС-КВЧ (n=20)	7,83 (7,35; 8,11) 100,4%	133,6 (126,3; 146,2) 95,0%	35,40 (33,63; 37,45) 82,5%*	46,20 (45,53; 47,40) 81,7%**	36,53 (36,11; 36,68) 123,5%***	17,21 (17,00; 17,48) 104,0%
ГК-КВЧ (n=20)	7,93 (7,70; 8,11) 101,7%*	123,0 (122,0; 129,8) 95,0%***	39,45 (38,15; 42,13) 92,0%	50,13 (48,73; 52,63) 88,6%	31,35 (29,40; 32,10) 105,9%	15,65 (15,08; 16,46) 94,6%
ОКСС-КВЧ (n=20)	8,31 (7,85; 8,90) 106,5%	142,4 (136,5; 149,7) 105,9%***	37,75 (35,65; 40,08) 88,0%	45,40 (45,23; 45,88) 80,2%	36,80 (36,45; 37,00) 124,3%***.***	17,00 (16,80; 17,23) 102,7%

Примечание: указаны медиана (25% и 75% квартили). * — $p \leq 0,05$, ** — $p \leq 0,01$, *** — $p \leq 0,001$, где p — достоверность отличий значений показателя по сравнению с контролем; ### — $p \leq 0,001$, где p — достоверность межгрупповых различий значений показателя в группах ГК и ГК-КВЧ; ◆◆ — $p \leq 0,001$, где p — достоверность межгрупповых различий значений показателя в группах ОКСС и ОКСС-КВЧ.

Note: the median (25th and 75th quartiles). * — $p \leq 0.05$, ** — $p \leq 0.01$, *** — $p \leq 0.001$, where p — statistically significant compared to the control; ### — $p \leq 0.001$, where p — statistically significant intergroup differences between the groups ГК and ГК-КВЧ; ◆◆ — $p \leq 0.001$, where p — statistically significant intergroup differences between the groups ОКСС and ОКСС-КВЧ.

данные показатели соответствовали физиологической норме, приведённой в справочниках [6, 11, 12].

Как показано в табл. 2, только в условиях гипокинетического (ГК) стресса наблюдалось увеличение количества эритроцитов на 12,7% ($p < 0,05$). При этом комбинированное воздействие ЭМИ КВЧ с данным стрессором (ГК-КВЧ) достоверно снижало этот показатель на 11,0% ($p < 0,05$), возвращая его к уровню контроля (количество эритроцитов при воздействии комбинации факторов ГК-КВЧ не отличалось достоверно от значений этого показателя в контроле).

Согласно литературным данным [1], рост количества эритроцитов был продемонстрирован на 7-е сут антиортостатической гипокинезии у мужчин, что согласуется с полученными данными. Следует отметить, что эффект 10-кратного КВЧ-воздействия на количество эритроцитов не отличался от контроля, что согласуется с литературой [4].

Таким образом, комбинация ГК-КВЧ способствует возникновению и проявлению нового физиологического эффекта в отношении количества эритроцитов, не свойственного каждому из этих факторов в отдельности. ЭМИ КВЧ в комбинации с ГК оказывает стресспротекторное действие, приводя данный показатель в пределы нормы.

Содержание гемоглобина (табл. 2) при комбинации ГК-КВЧ снижалось на 11,2% ($p < 0,001$) по сравнению с ГК, а при комбинации оксидативного стресса и КВЧ (ОКСС-КВЧ), наоборот, повышалось на 16,7% ($p < 0,001$) по сравнению с изолированным действием ОКСС, приводя данные показатели в рамки физиологической нормы, что также указывает на некоторый антистрессорный/гомеостатический эффект ЭМИ КВЧ.

Гематокрит при ОКСС снижался на 19,0% ($p < 0,05$), а комбинация ОКСС-КВЧ нивелировала этот эффект, т. к. в этом случае гематокрит существенно не отличался

от контроля. Острый стресс (ОС) не оказывал влияния на гематокрит венозной крови животных, тогда как комбинация ОС-КВЧ снижала этот показатель по сравнению с контролем на 17,5% ($p < 0,05$), что свидетельствует о некоторой гидратации плазмы [8]. Однако во всех этих случаях значения гематокрита находились в пределах физиологической нормы для самцов крыс [6, 11].

Похожая картина наблюдалась и в отношении эритроцитарного индекса MCV (табл. 2): комбинации ОС-КВЧ и ОКСС-КВЧ снижали этот показатель по сравнению с контролем на 18,3% ($p < 0,01$) и 19,8% ($p < 0,01$) соответственно, что говорит об увеличении числа микроцитов среди эритроцитов в соответствии с работой [8]. При этом MCV в группе ОКСС-КВЧ был достоверно ниже такового в группе ОКСС ($p < 0,001$).

Индекс MCHC (табл. 2) существенно возрастал относительно контроля после воздействия КВЧ — на 22,1% ($p < 0,05$), после воздействия ОС — на 22,6% ($p < 0,01$), ОС-КВЧ — на 23,5% ($p < 0,001$) и ОКСС-КВЧ — на 24,3% ($p < 0,001$). Это согласуется с литературными данными в отношении КВЧ, ГК и ОС [3, 6]. Так, в работе [1] было показано, что в ранний период пребывания в условиях антиортостатической гипокинезии (7-е сут) содержание гемоглобина в эритроцитах увеличивалось при отсутствии существенных изменений других показателей.

Лейкоцитарные гематологические показатели самцов крыс при изолированном воздействии стресс-факторов различной природы и их комбинаций с ЭМИ КВЧ

В контроле уровень количества лейкоцитов венозной крови самцов крыс соответствовал физиологической норме, приведённой в справочнике [11].

Количество лейкоцитов (табл. 3) снижалось при действии ОКСС (на 19,6%; $p < 0,05$) и его комбинации с КВЧ (ОКСС-КВЧ, на 23,9%; $p < 0,05$) по сравнению с контролем, при этом данный параметр не выходил за пределы физиологической нор-

Таблица 3. Лейкоцитарные гематологические показатели и индексы самцов крыс при изолированном воздействии стресс-факторов различной природы и их комбинаций с ЭМИ КВЧ

Table 3. Leukocyte hematological parameters and indices of male rats under isolated exposure to stress factors of various origins and their combinations with electromagnetic radiation of extremely high frequency

Группа	Показатель			
	WBC, 10 ⁹ /л	LYM, 10 ⁹ /л	MON, 10 ⁹ /л	GRA, 10 ⁹ /л
К (n=20)	9,2 (8,05; 12,58) 100,0%	5,25 (4,10; 7,43) 100,0%	1,80 (1,71; 1,80) 100,0%	2,25 (1,93; 2,98) 100,0%
КВЧ (n=20)	9,35 (6,73; 12,40) 101,6%	4,05 (2,93; 7,72) 77,1%	2,25 (1,63; 3,20) 125,0%	1,95 (0,80; 2,58) 86,7%
ОС (n=20)	9,65 (8,68; 18,13) 104,9%	5,70 (4,83; 10,9) 108,6%	2,40 (1,70; 5,15) 133,3%	2,20 (1,63; 2,60) 97,8%
ГК (n=20)	10,40 (9,08; 14,23) 113,0%	5,95 (4,60; 8,40) 113,3%	2,03 (1,92; 2,58) 111,1%	2,65 (2,23; 3,40) 117,8%
ОКСС (n=20)	7,40 (5,38; 7,67) 80,4%*	4,20 (3,63; 5,28) 80,0%	1,75 (1,03; 2,20) 97,2%	0,50 (0,30; 1,93) 44,4%**
ОС-КВЧ (n=20)	7,32 (6,20; 8,90) 79,6%*	4,65 (3,48; 5,35) 88,6%	1,50 (0,93; 1,88) 83,3%#*	2,05 (1,73; 2,40) 91,1%
ГК-КВЧ (n=20)	9,15 (8,05; 12,55) 99,5%	5,25 (4,03; 7,40) 100,6%	1,80 (1,70; 2,26) 101,5%	2,30 (1,90; 3,45) 102,2%
ОКСС-КВЧ (n=20)	7,00 (6,25; 7,88) 76,1%*	2,90 (2,50; 3,58) 55,2%**	2,00 (1,88; 2,45) 105,6%	1,35 (0,51; 2,05) 60,0%*

Примечание: указаны медиана (25% и 75% квантили). * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, где p – достоверность отличий значений показателя по сравнению с контролем; #* – $p \leq 0,01$, где p – достоверность межгрупповых различий значений показателя в группах ГК и ГК-КВЧ.

Note: the median (25th and 75th quartiles). * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, where p – statistically significant compared to the control; #* – $p \leq 0,01$, where p – statistically significant intergroup differences between the groups ГК and ГК-КВЧ.

мы. Эффект 10-кратного КВЧ-воздействия на количество лейкоцитов не отличался от контроля, что согласуется с данными, полученными в работе [4]. Кроме этого, комбинация ОС-КВЧ снижала количество лейкоцитов на 20,4% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Количество лимфоцитов (табл. 3) снижалось на 44,8% ($p < 0,01$) относительно контроля только при воздействии комбинации ОКСС-КВЧ, однако у большинства особей этот показатель находился в пределах референсного интервала, как и его медиана [13]. По другим литературным данным, этот показатель ниже физиологической нормы [6].

Количество гранулоцитов (табл. 3) существенно снижалось при изолированном воз-

действии ОКСС (на 55,6%; $p < 0,01$) и комбинации ОКСС-КВЧ (на 40,0%; $p < 0,05$), что свидетельствует о травматических повреждениях, свободнорадикальном повреждении мембран клеток [3, 8], однако при комбинации ОКСС-КВЧ повреждающее действие изолированного ОКСС ослаблялось.

Тромбоцитарные гематологические показатели самцов крыс при изолированном воздействии стресс-факторов различной природы и их комбинаций с ЭМИ КВЧ

Из всего пула тромбоцитарных гематологических показателей (табл. 4) самцов крыс увеличивался только средний объем тромбоцита (MPV) в условиях комбинированного применения ГК-КВЧ по сравнению

Таблица 4. Тромбоцитарные гематологические показатели и индексы самцов крыс при изолированном воздействии стресс-факторов различной природы и их комбинаций с ЭМИ КВЧ
Table 4. Platelet hematological parameters and indices of male rats under isolated exposure to stress factors of various origins and their combinations with electromagnetic radiation of extremely high frequency

Группа	Показатель		
	PLT, 10 ⁹ /л	MPV, фл	PCT, %
К (n=20)	297,5 (173,5; 402,5) 100,0%	8,20 (7,63; 8,68) 100,0%	24,5 (13,9; 33,4) 100,0%
КВЧ (n=20)	181,0 (161,3; 306,5) 60,8%	7,60 (6,63; 9,10) 92,7%	17,0 (10,9; 21,4) 69,5%
ОС (n=20)	159,5 (128,3; 433,3) 53,6%	7,35 (6,75; 9,81) 89,6%	14,6 (11,2; 30,6) 59,7%
ГК (n=20)	337,5 (197,0; 451,3) 113,4%	8,05 (7,53; 8,65) 98,2%	29,3 (16,6; 35,2) 119,8%
ОКСС (n=20)	175,0 (112,5; 228,3) 58,8%	8,75 (8,15; 9,68) 106,7%	15,9 (11,7; 20,8) 65,0%
ОС-КВЧ (n=20)	209,0 (136,0; 349,3) 70,3%	7,05 (6,45; 8,28) 86,0%	14,3 (11,5; 25,5) 58,3%
ГК-КВЧ (n=20)	387,0 (222,0; 480,3) 130,8%	10,20 (9,55; 10,20) 124,4% ^{..##}	29,7 (22,1; 44,5) 135,0%
ОКСС-КВЧ (n=20)	200,0 (106,5; 330,0) 67,2%	7,95 (7,13; 8,55) 97,0%	14,7 (6,8; 27,2) 59,9%

Примечание: указаны медиана (25% и 75% квантили). ** – $p \leq 0,01$, где p – достоверность отличий значений показателя по сравнению с контролем; ## – $p \leq 0,01$, где p – достоверность межгрупповых различий значений показателя в группах ГК и ГК-КВЧ.

Note: the median (25th and 75th quartiles). ** – $p \leq 0.01$, where p – statistically significant compared to the control; ## – $p \leq 0.01$, where p – statistically significant intergroup differences between the groups ГК and ГК-КВЧ.

с контролем (на 24,4%; $p \leq 0,01$) и по сравнению с изолированным воздействием КВЧ (на 31,7%; $p < 0,001$).

Таким образом, при комбинации ГК-КВЧ увеличивались только объёмные показатели тромбоцитов.

Заключение

Эритроцитарные гематологические показатели самцов крыс в большей степени изменялись при изолированном воздействии продолжительного стресс-фактора (ГК) и высокой интенсивности (ОКСС), чем кратковременного (ОС). В условиях ГК относительно контроля увеличивалось количество эритроцитов, при ОКСС снижался гематокрит, а при ОС возрастал ин-

декс МСНС. ГК-КВЧ по сравнению с ГК снижало количество эритроцитов и уровень гемоглобина, возвращая эти показатели к уровню контроля. ОКСС-КВЧ, наоборот, нивелировало эффект снижения гематокрита при ОКСС, но снижало МСV и повышало индекс МСНС. Компенсация стрессорного воздействия в данном случае происходила ещё и за счёт снижения объёма эритроцитов и увеличения суммарного содержания в них гемоглобина. Лейкоцитарные гематологические показатели самцов крыс изменялись только при изолированном воздействии ОКСС и комбинированном ОКСС-КВЧ, при этом комбинация ОКСС с ЭМИ КВЧ ослабляла стрессорный повреждающий эффект

ОКСС. При комбинации ГК-КВЧ увеличивались только объёмные показатели тромбоцитов.

Применение ЭМИ КВЧ в условиях моделирования у животных стресса разной продолжительности и интенсивности ока-

зывает стресспротекторный эффект, что делает данный физический фактор перспективным для дальнейших исследований его биологических эффектов в разных моделях патологических состояний, сопровождающихся развитием стресс-реакции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Иванова С.М., Морук В.В., Ярлыкова Ю.В., Лабетская О.И., Левина А.А., Козинец Г.И. Состояние системы крови у мужчин при длительной антиорто- статической гипокинезии. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2005;39(6):17–22. [Ivanova S.M., Morukov B.V., Yarlykova Yu.V., Labetskaya O.I., Levina A.A., Kozinets G.I. Sostoyanie sistemy krovi u muzhchin pri dlitel'noy antiortostaticheskoy gipokinezii [The red blood system in men during long-term head-down bed rest]. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina [Aerospace and Environmental Medicine]*. 2005;39(6):17–22. (In Russian)].
2. Казаринов К.Д., Щелконогов В.А., Чеканов А.В. Изучение чувствительности клеток крови человека к микроволновому излучению. *Журнал радиоэлектроники*. 2019;8:3–22. [Kazarinov K.D., Shchelkonogov V.A., Chekanov A.V. Izuchenie chuvstvitel'nosti kletok krovi cheloveka k mikrovolnovomu izlucheniyu [Studying the sensitivity of human blood cells to microwave radiation]. *Zhurnal radioelektroniki [Journal of Radio Electronics]*. 2019;8:3–22. (In Russian)]. DOI: 10.30898/1684-1719.2019.8.10
3. Камышников В.С. *Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике*. М.: МЕД-Пресс-информ, 2004. [Kamyshnikov V.S. *Spravochnik po kliniko-biokhimicheskim issledovaniyam i laboratornoy diagnostike [Handbook of clinical and biochemical research and laboratory diagnostics]*. Moscow, MED-Press-inform Publ., 2004. (In Russian)].
4. Карева Н.П., Ефремов А.В., Лосева М.И., Агеева Т.А., Позднякова С.В. Влияние миллиметровых волн на кроветворную систему в условиях нормы и в постцитостатический период. *Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина*. 2007;5(1):74–80. [Kareva N.P., Efremov A.V., Loseva M.I., Ageeva T.A., Pozdnyakova S.V. Vliyaniye millimetrovyykh voln na krovetvornuyu sistemu v usloviyakh normy i v postsitostaticheskiy period [Effect of millimeter waves of difference parameters on hemato- poietic system under normal conditions and in postcyto- static period]. *Vestnik NGU. Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina [Bulletin of the NSU. Series: Biology, clinical medicine]*. 2017;5(1):74–80. (In Russian)].
5. Коваленко Е.А., Гуровский Н.Н. Гипокинезия. М.: Медицина, 1980. [Kovalenko Ye.A., Gurovskiy N.N. *Gipokineziya [Hypokinesia]*. Moscow: Meditsina Publ., 1980. (In Russian)].
6. Макаров В.Н., Макарова М.Н. *Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных*. Справочник. СПб.: Изд-во «ЛЕМА», 2013. [Makarov V.N., Makarova M.N. *Fiziologicheskie, biokhimicheskie i biometricheskie pokazateli normy eksperimental'nykh zhivotnykh [Physiological, biochemical and biometric indicators of the norm of experimental animals]*. Spravochnik [Guide]. Saint Petersburg: LEMA Publ., 2013. (In Russian)].
7. Масляков В.В., Ильухин А.В. Воздействие крайне высоких частот на показатели лейкоцитов периферической крови у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. *Медицина*. 2017;1:80–88. [Maslyakov V.V., Ilyukhin A.V. Vozdeystvie kraynye vysokikh chastot na pokazateli leykotsitov perifericheskoy krovi u patsientov s khronicheskim generalizovannym parodontitom [Impact of extremely high frequencies on indices of peripheral blood leukocytes in patients with the chronic generalized periodontal disease]. *Meditsina [Medicine]*. 2017;1:80–88. (In Russian)].
8. Небыльцова О.В., Климова Ж.А., Носенко Г.А., Бойко И.В., Клишья М.А., Чернышова Л.А., Князева Л.П., Маликова С.В., Данилова И.Е., Абашева С.Н., Дегтяренко О.А., Прищепа Л.А. *Лабораторный справочник Синэво*. К.: ООО «Доктор-Медиа», 2011. [Nebyltsova O.V., Klimova Zh.A., Nosenko G.A., Boyko I.V., Klishnya M.A., Chernyshova L.A., Knyazeva L.P., Malikova S.V., Danilova I.E., Abasheva S.N., Degtyarenko O.A., Prishchepa L.A. *Laboratorynyy spravochnik Sinevo [Synevo Laboratory Reference Book]*. Kiev: Doktor-Media Publ., 2011. (In Russian)].
9. Раваева М.Ю., Чуян Е.Н. Адаптация тканевой микрогемодинамики к условиям комбинации стрессовых факторов. *Учёные записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия*. 2018;70(4):165–179. [Ravaeva M.Yu., Chuyan E.N. Adaptatsiya tkanevoy mikroge- modinamiki k usloviyam kombinatsii stressovykh faktorov [Adaptation of tissue microhemodynamics to the conditions of combination of stress factors]. *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo. Biologiya. Khimiya [Scientific Notes of V.I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry]*. 2018;70(4):165–179. (In Russian)].
10. Селье Г. *Очерки об адаптационном синдроме*. М.: Медгиз, 1960:254–255. [Sel'ye G. *Ocherki ob adaptat-*

- sionnom syndrome [Essays on the adaptation syndrome]. Moscow: Medgiz Publ., 1960:254–255. (In Russian).*
11. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.А., Оникиенко Ф.А. *Проблема нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы)*. М.: Медицина, 1991. [Trahtenberg I.M., Sova R.E., Sheftel V.A., Onikienko F.A. *Problema normy v toksikologii (sovremennye predstavleniya i metodicheskie podkhody; osnovnye parametry i konstanty) [The problem of norm in toxicology (modern concepts and methodological approaches, basic parameters and constants)]*. Moscow: Medicina Publ., 1991. (In Russian)].
12. Уша Б.В., Фатеева Е.И., Концевая С.Ю. *Организация доклинических исследований с использованием лабораторных животных в соответствии с правилами GLP*. М.: МГУПП, 2016. [Usha B.V., Fateeva E.I., Kontseva S.Yu. *Organizatsiya doklinicheskikh issledovaniy s ispol'zovaniem laboratornykh zhyvotnykh v sootvetstviy s pravilami GLP [Organization of preclinical studies using laboratory animals in accordance with the rules GLP]*. Moscow: MGUPP Publ., 2016. (In Russian)].
13. Юшков Б.Г., Корнева Е.А., Черешнев В.А. *Понятие нормы в физиологии и патофизиологии. Физиологические константы лабораторных животных*. Екатеринбург: УрО РАН, 2021. [Yushkov B.G., Korneva E.A., Chereshev V.A. *Ponyatie normy v fiziologii i patofiziologii. Fiziologicheskie konstanty laboratornykh zhyvotnykh [The concept of norm in physiology and pathophysiology. Physiological constants of laboratory animals]*. Ekaterinburg: UrO RAN Publ., 2021. (In Russian)].
14. Overmier J.B., Murison R., Johnsen T.B. Prediction of individual vulnerability to stress-induced gastric ulcerations in rats: A factor analysis of selected behavioral and biological indices. *Physiol. Behav.* 1997;61(4):555–562. DOI: 10.1016/s0031-9384(96)00502-1
15. Porsolt R.D., McArthur R.A., Lenegre A. *Psychotropic screening procedures. Methods in Behavioral Pharmacology*. Ed. by F. van Haaren. Elsevier, 1993:23–51.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ДИНАМИКА СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПОЧКАХ КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ АДРЕНОРЕАКТИВНОСТЬЮ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОДНОСТОРОННЕЙ ОБСТРУКЦИИ МОЧЕТОЧНИКА

Е.В. Черешнева¹, Д.А. Цомартова¹, М.Ю. Иванова¹, Э.С. Цомартова¹,
Т.А. Ломановская¹, М.С. Павлова¹, Э.Ф. Баринов², О.В. Паюшина^{1,*}

¹ ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)
119048, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

² ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет им. М. Горького»
Минздрава России

283003, Российская Федерация, Донецкая Народная Республика, Донецк, пр-кт Ильича, 16

На модели односторонней обструкции мочеточника крыс изучена зависимость адаптивных и компенсаторных реакций почки от чувствительности β_2 -адренорецепторов. Морфологию почки анализировали у крыс с различной адренореактивностью после 24, 48 или 72 ч обструкции мочеточника, либо спустя 30 сут после её устранения. У гиперреактивных крыс преобладали деструктивные изменения канальцев, снижение удельного объёма сосудов и интерстициальная лейкоцитарная инфильтрация, а у гипореактивных — вакуольная дистрофия эпителия канальцев и гемостаз в сосудах мозгового вещества. Спустя 30 сут после 72 ч обструкции изменения в почках гипер- и гипореактивных крыс были выражены сильнее, чем у нормореактивных. Таким образом, характер реакции почки на обструкцию мочеточника зависит от чувствительности β_2 -адренорецепторов, причём как повышенная, так и пониженная адренореактивность негативно влияют на восстановительный процесс.

Ключевые слова: обструктивная нефропатия, односторонняя обструкция мочеточника, экспериментальные модели, адренореактивность, β_2 -адренорецепторы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Черешнева Е.В., Цомартова Д.А., Иванова М.Ю., Цомартова Э.С., Ломановская Т.А., Павлова М.С., Баринов Э.Ф., Паюшина О.В. Динамика структурных изменений в почках крыс с различной адренореактивностью при моделировании односторонней обструкции мочеточника. *Биомедицина*. 2024;20(4):48–58. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-48-58>

Поступила 06.06.2024

Принята после доработки 10.07.2024

Опубликована 10.12.2024

STRUCTURAL CHANGES IN THE KIDNEYS OF RATS WITH DIFFERENT ADRENOREACTIVITY IN MODELED UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION

Elizaveta V. Cheresheva¹, Dibakhan A. Tsomartova¹, Marina Yu. Ivanova¹,
Elina S. Tsomartova¹, Tatyana A. Lomanovskaya¹, Mariya S. Pavlova¹,
Eduard F. Barinov², Olga V. Payushina^{1,*}

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)
119048, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8, building 2

² Donetsk State Medical University named after M. Gorky
283003, Russian Federation, Donetsk People's Republic, Donetsk, Ilyicha Ave., 16

The dependence of adaptive and compensatory reactions of the kidneys on the sensitivity of β_2 -adrenoreceptors was studied in a rat model of unilateral ureteral obstruction. The kidney morphology was examined after 24, 48, and 72 hours of obstruction or 30 days after its termination in rats with different adrenoreactivity. In hyperreactive rats, destruction of the tubules, reduced proportion of blood vessels, and leukocyte infiltration of the interstitium were predominant. However, vacuole dystrophy of the tubular epithelium and hemostasis in the medullary vessels prevailed in hyporeactive rats. Following 30 days after 72 h of obstruction, changes in the kidneys of hyper- and hyporeactive rats were more distinct than in normoreactive ones. Thus, the response of the kidneys to ureteral obstruction depends on the β_2 -adrenoreceptor sensitivity. Importantly both increased and decreased adrenoreactivity deteriorates the recovery.

Keywords: obstructive nephropathy, unilateral ureteral obstruction, experimental models, adrenoreactivity, β_2 -adrenoreceptors

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

For citation: Chereshneva E.V., Tsomartova D.A., Ivanova M.Yu., Tsomartova E.S., Lomanovskaya T.A., Pavlova M.S., Barinov E.F., Payushina O.V. Structural Changes in the Kidneys of Rats with Different Adrenoreactivity in Modeled Unilateral Ureteral Obstruction. *Journal Biomed.* 2024;20(4):48–58. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-48-58>

Submitted 06.06.2024

Revised 10.07.2024

Published 10.12.2024

Введение

Совершенствование тактики лечения обструктивной нефропатии требует выяснения причин вариабельности течения и исхода заболевания у разных пациентов, наблюдаемой даже при сходной длительности обструкции [3]. Вероятно, степень повреждения и полнота восстановления структуры и функций почки связаны с индивидуальной реактивностью организма, реализуемой через рецепторный аппарат клеток-мишеней [1, 8]. Имеющиеся данные о роли адренергической регуляции в реакциях почки на повреждающие воздействия [8, 10] позволяют предположить зависимость характера течения обструктивной нефропатии от плотности адренорецепторов. В этом случае оценка адренореактивности организма может служить для прогнозирования развития постобструктивных ренальных дисфункций.

Целью настоящего исследования стал анализ особенностей адаптивных и компенсаторных реакций почки в зависимости от чувствительности β_2 -адренорецепторов на экспериментальной модели односторонней обструкции мочеточника крысы.

Материалы и методы

В работе использовали 500 самцов нелинейных белых крыс массой тела 220 ± 30 г. Условия содержания животных и проведения экспериментов соответствовали всем применимым международным, национальным и институциональным принципам.

Чувствительность β_2 -адренорецепторов оценивали с помощью *in vitro* теста дезагрегации тромбоцитов, полученных у изучаемых животных. К суспензии тромбоцитов добавляли АДФ до концентрации 5 мкМ и изадрин (изопропилнорадреналин) до концентрации 10, 25, 50 и 100 мкМ.

Контролем служили пробы без изадрина. Пробы инкубировали 8–9 мин при 37°C и определяли степень дезагрегации тромбоцитов, измеряя оптическую плотность проходящего через суспензию светового потока на спектрофотометре СФ-46 («ЛОМО», Россия). Адренореактивность тромбоцитов оценивали по дозозависимому уменьшению агрегации, используя построенную кривую «доза-ответ».

Для моделирования обструкции мочеточника использовали по 60 крыс с нормальным, повышенным и пониженным уровнями адренореактивности. Под гексеналовым наркозом обнажали левый мочеточник, проводили через мышцы лигатуру из шёлка и выводили её концы на переднюю брюшную стенку. На мочеточник помещали полихлорвиниловую трубку длиной 0,5–0,6 см и диаметром 0,15–0,20 см. Лигатуру завязывали на передней брюшной стенке, сдавливая мочеточник между трубкой и мышцами. Для восстановления проходимости мочеточника через 24, 48 или 72 ч рассекали узел лигатуры. Контролем служили по 10 нормореактивных, гиперреактивных и гипореактивных ложнопериорванных крыс.

Животных выводили из эксперимента под гексеналовым наркозом по окончании срока обструкции или спустя 30 сут после восстановления пассажа мочи. Почки фиксировали 10%-ным формалином, парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином или (для выявления коллагеновых волокон) пикрофуксином по Ван-Гизону и анализировали на микроскопе Olympus BX-40 с цифровой фотокамерой Olympus U-TV1X и программным обеспечением Olympus DP-Soft (Япония). Удельные объёмы и морфологию структурных элементов почки оценивали в 7 зонах [12]: 1 — наружная полоска коркового вещества, 2 — внутренняя полоска коркового вещества, 3 — наружная полоска наружного мозгового вещества, 4 — внутренняя

полоска наружного мозгового вещества, 5–7 — внутреннее мозговое вещество.

Данные обрабатывали статистически с помощью пакета программ Statgraf 3.0 и Microsoft Excel («Microsoft Corp.», США) и представляли как $M \pm m$ (M — средняя арифметическая, m — стандартная ошибка). Статистическую значимость различий оценивали по критерию Стьюдента, различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Оценка чувствительности β 2-адренорецепторов

У интактных крыс анализ индуцированной АДФ агрегации тромбоцитов показал её ингибирование β -адреномиметиком изадрином. Рецептор-опосредованный механизм этого эффекта подтверждался его отменой при предварительном введении в инкубационную смесь 30 мкМ пропранолола — блокатора β 2-адренорецепторов. По величине концентрации изадрина, снижающей агрегацию тромбоцитов на 50% (IC_{50}), животные оказались распределены на три группы — с нормо-, гипо- и гиперадренореактивным состоянием организма. У нормореактивных крыс величина IC_{50} составляла 50–60 мкМ (в среднем $57,44 \pm 3,05$ мкМ), у гиперреактивных она была статистически значимо ниже — 20–25 мкМ ($23,06 \pm 1,91$ мкМ; $p < 0,05$), у гипореактивных — статистически значимо выше, 75–85 мкМ ($78,55 \pm 4,61$ мкМ; $p < 0,05$). Из 500 исследуемых животных было обнаружено 176 крыс с нормальной адренореактивностью (35,2% от общего числа животных), 100 — с повышенной (20,0%) и 224 — с пониженной (44,8%). Повторный анализ адренореактивности спустя 30 сут после моделирования односторонней обструкции мочеточника во всех группах крыс не выявил статистически значимых изменений IC_{50} и кривой «доза-ответ» по сравнению с исходными значениями,

что можно расценивать как подтверждение генетической детерминированности чувствительности рецепторного аппарата клеток организма. Таким образом, уровень чувствительности адренорецепторов тромбоцитов у крыс имеет индивидуальные различия, отражает генетическую детерминацию их стресс-реактивности и может модулировать структурные реакции нефронов при обструкции мочеточника.

Морфология почки при односторонней обструкции мочеточника

У интактных крыс не было выявлено явной зависимости морфологии почки от чувствительности адренорецепторов, однако характер структурных её изменений в ответ на обструкцию мочеточника различался у животных с разным уровнем адренореактивности.

Почечные тельца. У нормореактивных крыс уже после 24 ч обструкции отмечалась неравномерность кровенаполнения

капилляров клубочков и расширение просветов капсул, свидетельствующее об ультрафильтрации (рис. 1а). В почечных тельцах наружной зоны коркового вещества эти явления были выражены сильнее, чем в юкстамедуллярной зоне. При более длительной обструкции базальные мембраны клубочков утолщались, через 72 ч наблюдалось накопление мезангиального матрикса. У гиперреактивных животных после 24 ч обструкции капсулы почечных телец суперфициальных нефронов также были расширены, но просветы капилляров клубочков не отличались от таковых у интактных крыс. Продление обструкции до 72 ч приводило к запустеванию и спадению клубочков большинства почечных телец и максимальному расширению просветов капсул. У крыс с пониженной адренореактивностью изменения в почечных тельцах, а именно расширение капилляров клубочков и мочевых пространств капсул супер-

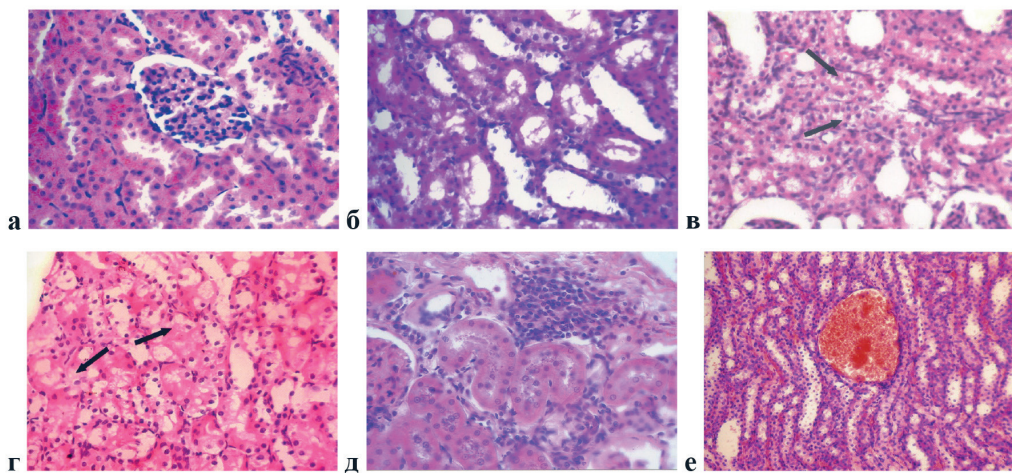


Рис. 1. Морфология почки при односторонней обструкции мочеточника: а, б — нормореактивные крысы, 24 ч обструкции; в, д — гиперреактивные крысы, 48 ч обструкции; з, е — гипореактивные крысы, 48 ч обструкции. Стрелками показаны вакуолизированные проксимальные извитые канальцы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: а, в, з, д — $\times 400$; б, е — $\times 200$.

Fig. 1. Kidney morphology in unilateral ureteral obstruction: а, б — normoreactive rats, 24 h of obstruction; в, д — hyporeactive rats, 48 h of obstruction; з, е — hyporeactive rats, 48 h of obstruction. Vacuolized proximal convoluted tubules are indicated by arrows. Hematoxylin and eosin staining. Magn.: а, в, з, д — $\times 400$; б, е — $\times 200$.

фициальных нефронов, впервые отмечались только после 48 ч обструкции. После 72 ч наблюдалось сморщивание клубочков.

Канальцы. У нормореактивных крыс через 24 ч обструкции проксимальные и дистальные извитые канальцы были расширены, их эпителий уплощён, в цитоплазме клеток отмечались умеренные гидропические изменения. В проксимальных извитых канальцах суперфициальных и корковых нефронов щётчатая каёмка имела неравномерную толщину (рис. 16). После 48–72 ч обструкции дилатация канальцев дистрофические изменения усиливались, наблюдались некроз и десквамация отдельных эпителиоцитов. Сходные изменения после 72 ч обструкции появлялись и в собирательных трубчатках. В суперфициальных и корковых нефронах нарушения на всех сроках были выражены сильнее, чем в юкстамедуллярных зонах. Через 72 ч появлялись канальцы с признаками регенерации, преимущественно в корковом веществе.

У гиперреактивных крыс после 24 ч обструкции обнаружены разрушение щётчатой каёмки проксимальных извитых канальцев, гидропическая трансформация клеток и дилатация просветов канальцев во всех зонах, прежде всего — дистальных канальцев и собирательных трубочек. В части канальцев выявлены очаги некроза и расширение межклеточных пространств. Вакуолизация клеток, отмеченная в дистальных отделах нефронов (рис. 1в), через 48 ч распространялась на проксимальные канальцы. По мере продления сроков обструкции она сменялась деструктивными изменениями (некрозом и десквамацией клеток), в особенности в суперфициальных и корковых нефронах. В отличие от нормореактивных крыс, канальцы с признаками регенерации после 72 ч обструкции появлялись главным образом в наружном мозговом веществе.

У гипореактивных крыс после 24 ч обструкции отмечалось лишь незначительное

набухание цитоплазмы клеток в канальцах коркового и наружного мозгового вещества; после 48 ч в них появлялись вакуоли (рис. 1г). После 72 ч обструкции вакуольная дистрофия в канальцах суперфициальных и корковых нефронов усиливалась, особенно в дистальных прямых канальцах наружного мозгового вещества. Канальцы с признаками некроза и десквамации клеток после 48 ч обструкции наиболее часто встречались в корковом веществе, а после 72 ч — в наружном мозговом. Очевидно, эти наблюдения отражают различную скорость реагирования суперфициальных, корковых и юкстамедуллярных нефронов при сниженной адренореактивности.

Строма и кровеносные сосуды. Результаты морфометрического анализа стромально-сосудистых компонентов почки приведены в таблице. Удельный объём клеток стромы у нормореактивных крыс значительно превышал исходные значения в корковом и, в меньшей степени, в мозговом веществе начиная с 48 ч обструкции, через 72 ч его рост продолжался. В корковом веществе гиперреактивных крыс прирост клеток стромы начинался уже после 24 ч обструкции и был более выражен, чем у нормореактивных.

Число клеток стромы в мозговом веществе возрастало после 48 и 72 ч обструкции, но в меньшей степени, чем в корковом веществе. Как у нормореактивных, так и у гиперреактивных крыс рост клеточности стромы коркового и наружного мозгового вещества был обусловлен накоплением лейкоцитов (рис. 1д). Во внутреннем мозговом веществе лейкоцитарные инфильтраты практически не обнаруживались, и динамика удельного объёма клеток стромы, очевидно, отражала число интерстициальных клеток, продуцирующих эйкозаноиды. У гипореактивных крыс характер изменения клеточности был принципиально иным: начиная с 48 ч обструкции, она снижалась во всех зонах почки. При этом, в отличие от нормо-

Таблица. Удельные объёмы клеток стромы и кровеносных сосудов при различной длительности обструкции мочеточника

Table. Proportions of stromal cells and blood vessels at different periods of ureteral obstruction

Показатель	Группа	Зона 1	Зона 2	Зона 3	Зона 4	Зона 5	Зона 6	Зона 7
Удельный объём клеток стромы, %	Норм 0 ч	2,9±0,2	3,2±0,1	3,1±0,2	5,0±0,3	7,9±0,5	10,3±0,8	10,5±0,3
	Норм 24 ч	3,3±0,4	3,8±0,3	4,4±0,2	5,0±0,2	8,2±0,4	11,0±0,6	10,7±0,4
	Норм 48 ч	4,1±0,3'	5,2±0,3'	7,0±0,5'	6,5±0,4'	8,6±0,5	13,8±0,8'	12,3±0,2'
	Норм 72 ч	6,2±0,6'	7,5±0,5'	8,1±0,4'	8,2±0,7'	9,4±0,6	15,1±0,9'	14,9±0,6'
	Гипер 0 ч	3,3±0,2	3,5±0,3	2,8±0,2	4,3±0,5	5,8±0,7	8,9±0,5	9,8±0,6
	Гипер 24 ч	8,1±0,4'	9,9±0,3'	6,1±0,2'	6,6±0,3	10,8±0,6	13,4±0,4	12,5±0,4
	Гипер 48 ч	10,5±0,3'	11,4±0,3'	7,9±0,2'	7,5±0,4'	12,3±0,3'	16,4±0,3'	18,6±0,4'
	Гипер 72 ч	13,5±0,6'	12,7±0,2'	10,5±0,4'	9,1±0,2'	14,8±0,4'	18,1±0,3'	20,4±0,9'
	Гипо 0 ч	2,3±0,2	2,5±0,3	2,8±0,2	4,3±0,5	5,8±0,7	8,9±0,5	9,8±0,6
	Гипо 24 ч	2,1±0,4	2,2±0,3	2,8±0,2	4,1±0,2	5,9±0,3	8,5±0,6	9,2±0,4
	Гипо 48 ч	1,9±0,1'	1,9±0,3'	3,1±0,2	3,8±0,1''	4,8±0,3'	7,7±0,6'	8,6±0,4'
	Гипо 72 ч	1,1±0,6'	1,4±0,2'	3,0±0,4	3,9±0,2	4,6±0,1'	5,1±0,5'	5,1±0,3'
Удельный объём сосудов, %	Норм 0 ч	4,2±0,2	4,3±0,3	8,7±0,5	26,9±0,8	15,8±0,4	16,5±0,3	17,1±0,3
	Норм 24 ч	3,6±0,1	3,9±0,2	7,2±0,4	21,8±0,9'	25,9±0,7'	25,1±0,9'	23,3±0,5'
	Норм 48 ч	3,5±0,3	3,8±0,2	7,0±0,5'	21,5±0,6	20,2±0,6''	19,4±0,5''	18,0±0,4
	Норм 72 ч	3,0±0,2'	3,5±0,3'	6,6±0,3'	20,1±0,5'	15,8±0,4	17,3±0,4	17,3±0,3
	Гипер 0 ч	3,2±0,2	3,8±0,3	7,1±0,5	24,8±0,8	14,1±0,4	13,5±0,3	16,8±0,8
	Гипер 24 ч	1,3±0,1'	1,4±0,2'	3,9±0,4'	20,1±0,9'	8,8±0,7'	9,0±0,9'	12,7±0,5'
	Гипер 48 ч	1,9±0,3'	2,7±0,2'	5,1±0,5'	20,9±0,6	8,7±0,6	7,3±0,5'	10,2±0,4'
	Гипер 72 ч	2,2±0,2	3,0±0,3	5,5±0,3	21,4±0,5	8,3±0,4	6,9±0,4	5,5±0,3
	Гипо 0 ч	6,8±0,2	7,4±0,3	9,7±0,5	28,5±0,8	18,0±0,4	18,4±0,3	18,6±0,8
	Гипо 24 ч	6,6±0,2	6,8±0,2	9,8±0,4	28,2±0,9	25,6±0,7'	22,7±0,9'	20,3±0,2'
	Гипо 48 ч	5,8±0,3	6,1±0,2	7,3±0,5'	27,9±0,6	24,3±0,6''	20,5±0,5'	19,7±0,4
	Гипо 72 ч	3,1±0,2'	4,5±0,3'	7,0±0,3'	26,3±0,5	19,1±0,4	16,6±0,4	15,8±0,3'

Примечание: Норм — нормореактивные животные, Гипер — гиперреактивные, Гипо — гипореактивные. * — различия с контролем (до обструкции) статистически значимы ($p < 0,05$).

Note: Норм — normoreactive animals, Гипер — hyperreactive animals, Гипо — hyporeactive animals. * — differences with the control (before the obstruction) are significant ($p < 0.05$).

и гиперреактивных крыс, у которых в стро-
 ме коркового вещества преобладали ней-
 трофилы и моноциты, у гипореактивных
 после 72 ч обструкции доминирующими
 становились лимфоциты и фибробласты.

Удельный объём сосудов у крыс с нор-
 мальной адренореактивностью незначи-
 тельно снижался в корковом веществе
 после 72 ч обструкции, а в мозговом ве-
 ществе — повышался через 24 ч и восста-
 навливался практически до исходных зна-
 чений при более длительной обструкции.
 Реакция сосудистого русла почки гипер-
 реактивных крыс проявлялась снижением

удельного объёма сосудов во всех зонах,
 начиная с 24 ч обструкции. Однако если
 в корковой и наружной зоне мозгового ве-
 щества после 48 и 72 ч он имел тенденцию
 к восстановлению, то в более глубоких
 областях мозгового вещества продолжал
 снижаться. При этом перитубулярные ка-
 пилляры, после 24 ч характеризовавшиеся
 повышенным кровенаполнением, на более
 поздних сроках выглядели спавшимися,
 и интерстиций вокруг них был инфильт-
 рирован лейкоцитами. У гипореактивных
 крыс реакция сосудов была неодинаковой
 в различных зонах почки: в корковом и на-

ружном мозговом веществе их удельный объём снижался после 48–72 ч обструкции, а во внутреннем мозговом веществе — повышался через 24 ч и снижался лишь после 72 ч. В мозговом веществе при этом наблюдали полнокровие венозных сосудов (рис. 1е). Не наблюдалась существенная периваскулярная инфильтрация.

Кроме того, во всех группах животных был выявлен отёк интерстиция коркового вещества с увеличением его удельного объёма и гистологическими признаками накопления жидкости. У нормореактивных крыс он развивался после 48 ч обструкции, у гиперреактивных — уже после 24 ч и был более выраженным. У гипореактивных животных существенного отёка стромы в ответ на обструкцию не происходило.

Адаптивно-компенсаторные реакции почки в восстановительный период

Морфологию почки оценивали через 30 сут после устранения обструкции мочеточника. К этому сроку в случае 24-ча-

совой обструкции у нормореактивных крыс структура органа была практически восстановлена. У гиперреактивных крыс число повреждённых канальцев (с вакуолизацией и десквамацией клеток) было меньшим, чем непосредственно после обструкции, но репарация оставалась неполной. При этом доля повреждённых проксимальных и дистальных извитых канальцев в суперфициальных и корковых нефронах была выше, чем в юкстамедуллярных зонах. Вокруг клубочков с признаками гиперперфузии и вакуолизированных канальцев выявлялись коллагеновые волокна, что указывало на активацию фибриллогенеза. Гипореактивных крыс не изучали, т. к. у них **24-часовая обструкция** не вызвала значимых изменений.

Через 30 сут после **48-часовой обструкции** в почках нормореактивных крыс доля канальцев с признаками вакуолизации и деструкции снижалась по сравнению с таковой по окончании обструкции. Сохранялся

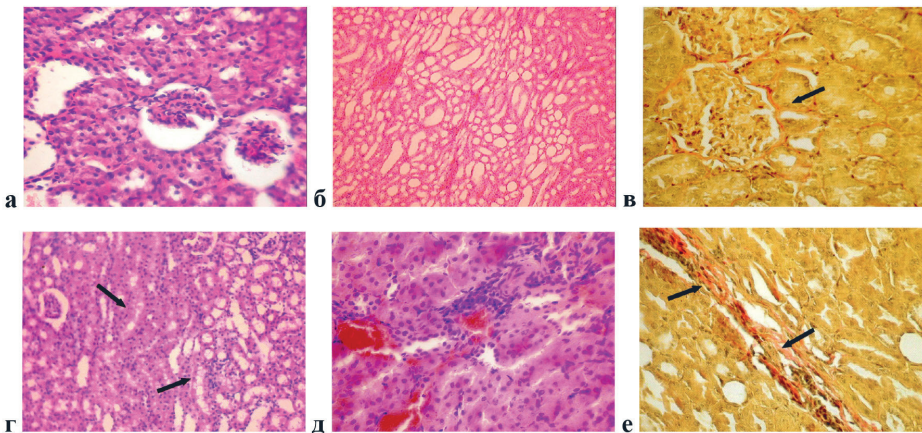


Рис. 2. Морфология почки через 30 сут после односторонней обструкции мочеточника длительностью 72 ч: а, б, в — гиперреактивные крысы; г, д, е — гипореактивные крысы. Стрелками показаны: в — коллагеновые волокна вокруг почечного тельца; г — гидропически изменённые собирательные трубочки; е — пучки коллагеновых волокон вокруг прямых сосудов. Окрашивание: а, б, г, д — гематоксилин и эозин; в, е — по Ван-Гизону. Ув.: а, в, д, е — $\times 400$; б, г — $\times 100$.

Fig. 2. Kidney morphology 30 days after unilateral ureteral obstruction lasting 72 h: а, б, в — hyperreactive rats; г, д, е — hyporeactive rats. Collagen fibers around the renal corpuscle (в), hydropic changes in the collecting tubules (г) and bundles of collagen fibers around vasa recta (е) are indicated by arrows. Coloring: а, б, г, д — hematoxylin and eosin; в, е — Van Gieson staining. Magn.: а, в, д, е — $\times 400$; б, г — $\times 100$.

незначительный отёк интерстиция, вокруг сосудов коркового вещества выявлялись одиночные инфильтраты, содержащие макрофаги и малочисленные лимфоциты. Капилляры перитубулярной сети, междольковые сосуды коркового вещества, прямые сосуды мозгового вещества были полнокровными; более выраженный стаз крови определялся в венозных отделах. У гиперреактивных крыс также отмечалось снижение доли повреждённых канальцев; гидропические процессы в них преобладали над некрозом. Многие почечные тельца имели спавшиеся капилляры клубочков и суженное мочевое пространство. Расширенные и гидропически изменённые собирательные трубочки были, как правило, окружены лимфоцитами. У гипореактивных крыс структура почки была в основном восстановлена, сохранялись лишь незначительные гидропические изменения в клетках дистальных прямых канальцев и морфологические нарушения в единичных проксимальных и дистальных извитых канальцах.

Спустя 30 сут после **72-часовой обструкции** у нормореактивных крыс большинство канальцев (около 90%) имели нормальное строение, в остальных отмечались в основном гидропические явления. Степень клеточной инфильтрации стромы снижалась. В корковом веществе отмечалась вазоконстрикция, в сосудах наружного мозгового вещества — полнокровие и стаз. Сохранялся периваскулярный отёк в мозговом веществе. У гиперреактивных крыс структура почки была серьёзно нарушена: имела значительная доля деструктивно изменённых канальцев, капсулы почечных телец были резко расширены, а окружающие их канальцы вакуолизированы (рис. 2а). Кровенаполнение прямых сосудов превышало таковое у нормореактивных крыс, сопровождающие их петли Генле были расширены (рис. 2б). Клетки прямых канальцев и собирательных трубочек имели

набухшую цитоплазму. Отмечался усиленный фибриллогенез вокруг повреждённых канальцев и почечных телец с признаками нарушения оттока мочи (рис. 2в). У гипореактивных крыс изменения во всех зонах почки также были значительными. В корковом веществе выявлялись проксимальные и дистальные извитые канальцы с признаками деструкции, спавшиеся канальцы без чёткой щёточной каёмки и атрофичные, кистозно-расширенные, с белковыми массами в просвете. В наружном мозговом веществе преобладали канальцы с десквамацией эпителиоцитов, во многих наблюдалась вакуолизация. Клетки дистальных прямых канальцев и собирательных трубочек часто имели гидропические и некротические изменения (рис. 2г). Перечисленные нарушения чаще выявлялись в юкстамедуллярных нефронах, чем в корковых. В строме сохранялись клеточные инфильтраты, состоящие в основном из лимфоцитов (рис. 2д), и продолжалось накопление коллагеновых волокон вокруг перитубулярных капилляров (рис. 2е). Сосуды в участках с повреждёнными канальцами были расширенными и полнокровными, а в зонах с избыточным коллагенообразованием — спавшимися.

Таким образом, различия в ходе репаративного процесса у крыс с неодинаковой реактивностью адренорецепторов были наиболее существенными в случае длительной, 72-часовой обструкции мочеточника. При этом через 30 сут после восстановления пассажа мочи в почках как гиперреактивных, так и гипореактивных животных, в отличие от нормореактивных, сохранялись выраженные деструктивные изменения.

Обсуждение результатов

Анализ структуры почек после обструкции мочеточника показал зависимость характера реактивных изменений от чувствительности адренорецепторов. У гиперреактивных крыс по сравнению

с нормореактивными были сильнее выражены деструктивные изменения канальцев, а у гипореактивных — вакуольная дистрофия. Склероз почечных телец при длительной обструкции был более характерен для крыс с повышенной или пониженной адренореактивностью, чем для нормореактивных. У гиперреактивных крыс имели место выраженный отёк стромы и её инфильтрация нейтрофилами и моноцитами, которая, вероятно, и вызывала повреждение клеток канальцев. У гипореактивных крыс инфильтрация была менее выраженной, с преобладанием лимфоцитов и фибробластов. Наши наблюдения не согласуются с имеющимися данными о противовоспалительных эффектах стимуляции β_2 -адренорецепторов при повреждении почки [4, 9]. Однако, обсуждая причины выявленных различий, надо учитывать и реакцию микрососудов, т. к. развитие воспаления зависит от проницаемости эндотелия. По разным данным, активация β -адренорецепторов способна как снижать её [7], так и повышать [13]. Возможно, в наших экспериментах повреждение эндотелия, нарушающее селективность миграции лейкоцитов в ткани, было вызвано эйкозаноидами [5], продукция которых подвержена адренергической регуляции [11]. В целом же реакция сосудов почки на обструкцию мочеточника, очевидно, определялась суммацией вазомодулирующих эффектов симпатической нервной системы и локальных факторов (ангиотензина II, NO), а также механического влияния нарушения пассажа мочи [2, 14]. Однако, судя по обнаруженным различиям в удельном объёме сосудов между группами животных, активация адренорецепторов также вносила вклад в нарушение микроциркуляции.

Изменения в микроциркуляторном русле почки при обструкции мочеточника способны индуцировать постобструктивную

нефропатию из-за развития воспаления и нарушения трофики нефронов. Как известно, после восстановления оттока мочи повреждение почек может прогрессировать, приводя к интерстициальному фиброзу [6]. Наши результаты свидетельствуют о высоком риске развития постобструктивной нефропатии при повышенной чувствительности адренорецепторов: если у нормореактивных крыс структура нефронов постепенно восстанавливалась даже после 72-часовой обструкции, то у гиперреактивных она оставалась значительно нарушенной, по крайней мере, в течение 30 сут. У гипореактивных крыс также сохранялись изменения, препятствующие структурному восстановлению, — вакуольная дистрофия и деструкция клеток канальцев, склероз интерстиция. Вероятно, ход восстановительного периода, как и выраженность нарушений непосредственно после обструкции, в значительной мере определялся состоянием микрососудов и клеточным составом инфильтратов. Однако уточнение клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе наблюдаемых различий, требует дальнейших исследований.

Выводы

Характер адаптивных и компенсаторных реакций почки после обструкции мочеточника зависят от индивидуальной чувствительности β_2 -адренорецепторов, причём как повышенная, так и пониженная адренореактивность негативно влияет на восстановительный процесс и способствует развитию постобструктивной нефропатии.

Таким образом, индивидуальные особенности адренергической системы определяют различия в степени альтерации и репарации почки при обструкции мочевыводящих путей и должны учитываться при прогнозировании исхода заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Баринов Э.Ф., Волошин В.В., Черешнева Е.В. Структурно-функциональное состояние почки у крыс с различной активностью внутриклеточной системы eNOS-NO-протеинкиназа G после обструкции мочеточника. *Актуальные проблемы транспортной медицины*. 2007;4(10):113–117. [Barinov E.F., Voloshin V.V., Cheresheva E.V. Strukturno-funktsional'noye sostoyaniye pochki u kryс s razlichnoy aktivnost'yu vnutrikletочноy sistemy eNOS-NO-proteinkinaza G posle obstruktsii mochetchnika [Structural and functional state of kidneys in rats with different activity of intracellular system eNOS-NO-protein kinase G after uretral obstruction]. *Aktual'nyye problemy transportnoy meditsiny [Actual Problems of Transport Medicine]*. 2007;4(10):113–117. (In Russian)].
2. Chen C.F., Yeh S.U., Chien C.T., Wu M.S. Renal response during acute unilateral ureteral obstruction in rats. *Neurourol. Urodyn.* 2001;20(1):125–137. DOI: 10.1002/1520-6777(2001)20:1<125::aid-naul4>3.0.co;2-y
3. Chevalier R.L. Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy. *Curr. Opin. Pediatr.* 2006;18(2):153–160. DOI: 10.1097/01.mop.0000193287.56528.a4
4. Dorotea D., Ha H. Activation of β_2 adrenergic receptor signaling modulates inflammation: A target limiting the progression of kidney diseases. *Arch. Pharm. Res.* 2021;44(1):49–62. DOI: 10.1007/s12272-020-01280-9
5. Fan F., Ge Y., Lv W., Elliott M.R., Muroya Y., Hirata T., Booz G.W., Roman R.J. Molecular mechanisms and cell signaling of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in vascular pathophysiology. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 2016;21(7):1427–1463. DOI: 10.2741/4465
6. Ito K., Chen J., El Chaar M., Stern J.M., Seshan S.V., Khodadadian J.J., Richardson I., Hyman M.J., Vaughan E.D. Jr, Poppas D.P., Felsen D. Renal damage progresses despite improvement of renal function after relief of unilateral ureteral obstruction in adult rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2004;287(6):F1283–F1293. DOI: 10.1152/ajprenal.00441.2003
7. Joffre J., Lloyd E., Wong E., Chung-Yeh C., Nguyen N., Xu F., Legrand M., Hellman J. Catecholaminergic vasopressors reduce Toll-like receptor agonist-induced microvascular endothelial cell permeability but not cytokine production. *Crit. Care Med.* 2021;49(3):e315–e326. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004854
8. Li Q., Deng Y., Liu L., Zhang C., Cai Y., Zhang T., Han M., Xu G. Sympathetic denervation ameliorates renal fibrosis via inhibition of cellular senescence. *Front. Immunol.* 2022;12:823935. DOI: 10.3389/fimmu.2021.823935
9. Nakamura A., Imaizumi A., Yanagawa Y., Kohsaka T., Johns E.J. beta(2)-Adrenoceptor activation attenuates endotoxin-induced acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004;15(2):316–325. DOI: 10.1097/01.asn.0000111247.76908.59
10. Noh H., Yu M.R., Kim H.J., Lee J.H., Park B.W., Wu I.H., Matsumoto M., King G.L. Beta 2-adrenergic receptor agonists are novel regulators of macrophage activation in diabetic renal and cardiovascular complications. *Kidney Int.* 2017;92(1):101–113. DOI: 10.1016/j.kint.2017.02.013
11. Osborn J.L., Johns E.J. Renal neurogenic control of renin and prostaglandin release. *Miner. Electrolyte Metab.* 1989;15(1–2):51–58.
12. Pfaller W., Rittinger M., Fischer W.M. A concept for stereological investigation of rat kidney. *Microsc. Acta.* 1979;82(2):137–145.
13. Sorribas M., de Gottardi A., Moghadamrad S., Hassan M., Spadoni I., Rescigno M., Wiest R. Isoproterenol disrupts intestinal barriers activating gut-liver-axis: Effects on intestinal mucus and vascular barrier as entry sites. *Digestion.* 2020;101(6):717–729. DOI: 10.1159/000502112
14. Truong L.D., Gaber L., Eknayan G. Obstructive uropathy. *Contrib. Nephrol.* 2011;169:311–326. DOI: 10.1159/000314578

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Черешнева Елизавета Васильевна, к.м.н., доц., ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: yelizaveta.new@mail.ru

Elizaveta V. Cheresheva, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University);
e-mail: yelizaveta.new@mail.ru

Цомартова Дибакхан Асланбековна, д.м.н., доц., ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: dtsomartova@mail.ru

Dibakhan A. Tsomartova, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University);
e-mail: dtsomartova@mail.ru

Иванова Марина Юрьевна, к.м.н., доц.,
ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: ivanova_m_y@mail.ru

Marina Yu. Ivanova, Cand. Sci. (Med.), Assoc.
Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical
University (Sechenov University);
e-mail: ivanova_m_y@mail.ru

Цомартова Элина Сослановна, к.м.н., ФГАОУ
ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Мин-
здрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: elina.tsomartova@gmail.com

Elina S. Tsomartova, Cand. Sci. (Med.), I.M. Se-
chenov First Moscow State Medical University
(Sechenov University);
e-mail: elina.tsomartova@gmail.com

Ломановская Татьяна Александровна, к.м.н.,
ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: tatyana_80@inbox.ru

Tatyana A. Lomanovskaya, Cand. Sci. (Med.),
I.M. Sechenov First Moscow State Medical
University (Sechenov University);
e-mail: tatyana_80_80@inbox.ru

Павлова Мария Сергеевна, ФГАОУ ВО «Пер-
вый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава
России (Сеченовский Университет);
e-mail: pavlova_m_s@student.sechenov.ru

Mariya S. Pavlova, I.M. Sechenov First Moscow
State Medical University (Sechenov University);
e-mail: pavlova_m_s@student.sechenov.ru

Баринов Эдуард Федорович, д.м.н., проф.,
ФГБОУ ВО «Донецкий государственный ме-
дицинский университет им. М. Горького»
Минздрава России;
e-mail: barinov.ef@gmail.com

Eduard F. Barinov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Donetsk
State Medical University named after M. Gorky;
e-mail: barinov.ef@gmail.com

Паюшина Ольга Викторовна*, д.б.н., доц.,
ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: payushina@mail.ru

Olga V. Payushina*, Dr. Sci. (Biol.), Assoc.
Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical
University (Sechenov University);
e-mail: payushina@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-59-69>



ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОГЛИИ В СТРУКТУРАХ СРЕДОСТЕНИЯ НОВОРОЖДЁННОЙ КРЫСЫ

Е.И. Чумасов^{1,2,*}, Е.С. Петрова¹, Д.Э. Коржевский¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197022, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»
196084, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5

Цель настоящей работы — сравнительно-морфологическое изучение разнообразия глиальных клеток в тканях и органах средостения новорожденных крыс с помощью иммуногистохимических маркеров. У крыс в возрасте 1 сут на фронтальных срезах через сердечно-лёгочный комплекс изучали иннервацию органов сердечно-сосудистой, пищеварительной и дыхательной систем (с помощью применения нейрального иммуногистохимического маркера белка PGP 9.5 и глиальных маркеров — GFAP и S100β). В органах средостения выявлены два типа глии: астроцитоподобные клетки и нейролеммоциты. Астроцитоподобные клетки имеют сходство с глией центральной нервной системы, нейролеммоциты или шванновские клетки — с глией периферической нервной системы. Одни обнаружены в нейропиле ауэрбахова ганглиозного сплетения энтеральной нервной системы пищевода, а другие — в ганглиях, микроганглиях, в крупных стволах и пучках нервных сплетений парасимпатического и симпатического отделов соматической и автономной нервной системы. Среди нейролеммоцитов в средостении выделены популяции: миелинообразующие шванновские клетки, нейролеммоциты немиелинизированных нервных волокон, нейролеммоциты пучков Ремака основного терминального синаптического сплетения, а также сателлитные или капсульные клетки нейроцитов интрамуральных ганглиев. Учитывая современное представление о значении глии для функционирования жизненно важных органов в норме, а также её влияние на сохранение целостности нервных структур при патологии, результаты настоящего исследования важны для проведения биомедицинских исследований по разработке новых способов терапии, направленных на изменение функционального статуса глиальных клеток, в будущем.

Ключевые слова: органы средостения, новорожденная крыса, глия, белок S100β, глиальный фибриллярный кислый белок, иммуногистохимия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Для цитирования: Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Иммуногистохимическое исследование нейроглии в структурах средостения новорожденной крысы. *Биомедицина*. 2024;20(4):59–69. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-59-69>

Поступила 17.05.2024

Принята после доработки 05.06.2024

Опубликована 10.12.2024

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF NEUROGLIA IN THE MEDIASTINUM STRUCTURES OF NEWBORN RATS

Evgenii I. Chumasov^{1,2,*}, Elena S. Petrova¹, Dmitry E. Korzhevskii¹

¹ Institute of Experimental Medicine
197022, Russian Federation, Saint Petersburg, Akademika Pavlova Str., 12

² Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine
196084, Russian Federation, Saint Petersburg, Chernigovskaya Str., 5

In this work, we conduct a comparative morphological study of the diversity of glial cells in the tissues and organs of the mediastinum of newborn rats using immunohistochemical markers. In rats aged 1 day, the innervation of the organs of the cardiovascular, digestive, and respiratory systems was studied in frontal sections through the cardiopulmonary complex (using the neural immunohistochemical protein marker PGP 9.5 and glial markers GFAP and S100 β). In the mediastinal organs (SRDS), two type of glia — astrocyte-like cells and neurolemmocytes — were revealed. Astrocyte-like cells are similar to the glia of the CNS, neurolemmocytes or Schwann cells are similar to the glia of the PNS. Some were found in the neuropil of the Aurbach's ganglionic plexus of the enteric nervous system of the esophagus, and others were detected in the ganglia, microganglia, in the large trunks, and bundles of the nerve plexuses of the parasympathetic and sympathetic divisions of the somatic and autonomic nervous system. Among the neurolemmocytes in the SRDS, the following populations were identified: myelin-forming Schwann cells, neurolemmocytes of unmyelinated nerve fibers, neurolemmocytes of the Remak fascicles of the main terminal synaptic plexus, as well as satellite or capsule cells of neurocytes of the intramural ganglia. According to the modern knowledge, glia plays an important role in the functioning of vital organs in the norm, as well as in the preservation of the integrity of neural structures in pathology. Therefore, the results obtained are important for biomedical research on the development of new therapies aimed at changing the functional status of glial cells.

Keywords: mediastinal organs, postnatal period of ontogenesis, glia, S100 β protein, glial fibrillary acidic protein, immunohistochemistry

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

Funding: the study was carried out within the framework of the state assignment of the Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”.

For citation: Chumasov E.I., Petrova E.S., Korzhevskii D.E. Immunohistochemical Study of Neuroglia in the Mediastinum Structures of Newborn Rats. *Journal Biomed.* 2024;20(4):59–69. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-59-69>

Submitted 17.05.2024

Revised 05.06.2024

Published 10.12.2024

Введение

Область средостения, в которой располагаются такие жизненно важные органы, как сердце, лёгкие, пищевод, лимфатические узлы, магистральные сосуды и трахея, имеет высокую степень иннервации. В литературе достаточно много работ: монографий, обзоров, статей, посвящённых иннервации разных органов и отделов пищеварительной, дыхательной и сердечно-сосудистой систем, в которых авторы описали свето- и электронно-микроскопически множество нервных структур: ганглиев, параганглиев, нервных сплетений, рецепторных нервных окончаний [5, 7, 9, 10, 18,

30]. В настоящее время для исследования иннервации органов начинают широко использоваться и современные иммуногистохимические методы, позволяющие селективно выявлять нервные аппараты различной медиаторной природы [4, 15]. В предыдущих наших исследованиях, выполненных с использованием ИГХ-маркеров [15, 17], была отмечена высокая концентрация нервных аппаратов в разных отделах средостения как у взрослых животных, так и в период раннего постнатального периода развития крысы [17]. Однако динамика развития глиальных клеток, их морфологическое разнообразие и функции

в ранний постнатальный период развития изучены недостаточно. Важность этого периода связана с тем, что у новорожденных млекопитающих происходит «переключение» оксигенации на малый круг с плацентарного, и изменяется циркуляция в камерах сердца.

Цель настоящей работы — сравнительно-морфологическое изучение разнообразия глиальных клеток в тканях и органах средостения новорожденных крыс с помощью иммуногистохимических маркеров.

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах (самцах и самках) популяции линий Wistar в возрасте 1 сут постнатального развития (P1) (n=10). Крысы были получены из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.), содержались в стандартных условиях вивария. У новорожденных крыс выделяли комплекс органов, располагающихся в центральном средостении. При работе с животными соблюдали международные правила Европейского сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины. Материал фиксировали в р-ре цинк-этанол-формальдегида в течение 1 сут [10] и после обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации и ксилолу заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Pfm Rotary 3003 («PFM», Германия). На срезах после депарафинирования проводили иммуногистохимические реакции на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), белок PGP 9.5 и белок S100β. Для выявления белка PGP 9.5 использовали поликлональные кроличьи антитела («Spring Bioscience», США). Для исследования клеток глии периферической нервной системы применяли ИГХ-реакции на белок

S100β и глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела к белку S100β. Для выявления GFAP — моноклональные мышинные антитела (клон SPM 507) («Spring Bioscience», США). Для выявления нервных волокон применяли поликлональные кроличьи антитела к белку PGP 9.5 («Spring Bioscience», США). В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SPD-015, «Spring Bioscience», США). Часть препаратов окрашивали толуидиновым синим по Нисслю и астровым синим. Для осуществления отрицательного контроля иммуногистохимических реакций на часть срезов вместо р-ра первичных антител наносили их разбавитель («Dako», Дания; сейчас — «Agilent», США). Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Leica DM 750 («Leica», Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 («Leica», Германия).

Результаты исследований

На гистологических срезах, сделанных через область центрального средостения новорожденной крысы, определяется ряд органов: сердце, ганглии, трахея и два главных бронха, фрагменты пищевода и лимфатических узлов, венозные и артериальные сосуды, ветви вагосимпатического и возвратного нервов, дольки формирующейся жировой ткани. Все эти структуры окружены рыхлой соединительной тканью (рис. 1). С помощью применения ИГХ-реакций на нейтральные и глиальные маркеры установлено, что в области средостения крыс выявляются ганглиозные сплетения, состоящие из нейтральных элементов холинергической и катехоламинергической природы и сопровождающей их глии. В разных участках соединительной ткани встречаются ганглии и микроганглии, островки и группы хромаффинных клеток, фрагмен-

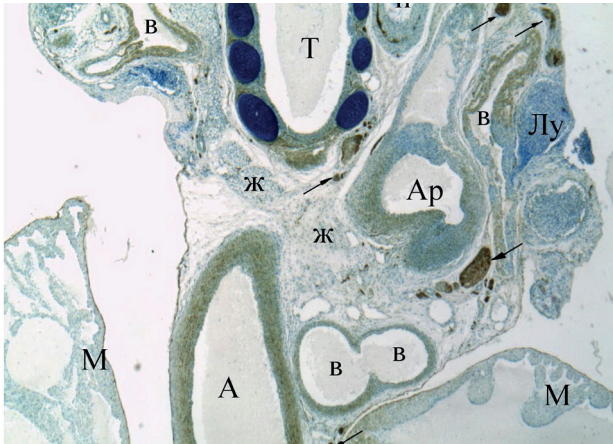


Рис. 1. Органы средостения новорождённой крысы. П — пищевод, Т — трахея, М — миокард ушек предсердий, ↑↑ — нервные стволы и пучки, В — вены, А — аорта, Ар — артерия; ЛУ — лимфатические узлы, Ж — дольки жировой ткани. Иммуногистохимическая реакция на белок PGP 9.5. Поокраска толуидиновым синим. Фиксация материала в р-ре цинк-этанол-формальдегида. Ув.: ×40.

Fig. 1. Organs of the mediastinum of a newborn rat. П — esophagus, Т — trachea, М — myocardium of the atrial appendages, ↑↑ — nerve trunks and bundles, В — veins, А — aorta, Ар — artery; ЛУ — lymph nodes, Ж — lobules of adipose tissue. Immunohistochemical reaction to PGP 9.5 protein. Toluidine blue. Fixation of the material in a zinc-ethanol-formaldehyde solution. Magn.: ×40.

ты крупных нервных стволиков и пучков, образующих различной степени плотности сплетения. Наиболее выраженными в средостении новорождённой крысы являются нервные стволы вагосимпатического и возвратного нервов, которые дают общие ветви, иннервируя тесно прилежащие друг к другу органы (рис. 1).

Использование нейростологического метода (окраска толуидиновым синим) и ИГХ-реакций позволило установить, что ганглии средостения состоят из нервных и глиальных клеток различной степени дифференцировки. У новорождённых животных с помощью ИГХ-реакции на S100β иммуноположительные глиальные клетки селективно выявляются в ганглиях, в нервных стволиках и пучках основного терминального нервного сплетения. Они определяются по чёрного цвета ядрам и коричневым тонам цитоплазме (рис. 2). В ганглиях, локализованных вблизи миокарда правого предсердия, можно видеть глиальные элементы — клетки-сателлиты.

Они располагаются разреженно среди нейробластов и молодых нейронов (рис. 2а). На рисунке прослеживается также отходящий от нервного узла тонкий тяж из нейролеммоцитов, который вместе с капилляром проникает в миокард. На рис. 2б представлен ганглий нервного сплетения аортально-пульмональной области. Единичные клетки-сателлиты округлой формы расположены в тесной связи с перикарионами нейронов, в то время как веретеновидной формы нейролеммоциты, располагаясь цепочками, находятся в тесных взаимоотношениях с многочисленными аксонами безмиелиновых нервных волокон эндоневрия пучков.

Как было отмечено, в средостении постоянно обнаруживаются фрагменты пищевода. В его мышечной оболочке, начиная со стадии P1, с помощью ИГХ-реакций на белок GFAP и S100β выявляется два типа глиальных клеток. Применение GFAP, характерного для астроцитов ЦНС, позволило выявить типичную иммунореактивность

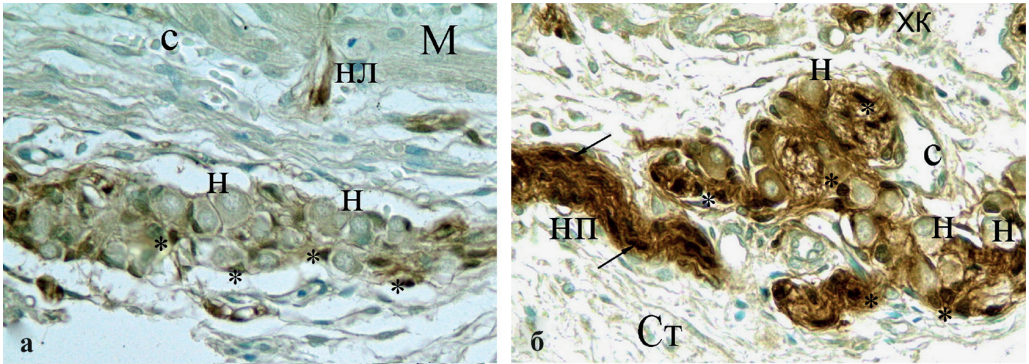


Рис. 2. Ганглии средостения новорождённой крысы. а — ганглий эпикардиального сплетения вблизи миокарда предсердия, б — ганглий между пищеводом и трахеей. Н — нейроны, Нн — нервный пучок, * — клетки-сателлиты нейронов, ↑↑ — нейролеммоциты пучка нервных волокон, М — миокард, Нл — нейролеммоцитарный тяж; Ст — соединительная ткань, С — кровеносные сосуды, ХК — группа хромоаффинных клеток. Иммуногистохимическая реакция на белок S100 β , подкраска толуидиновым синим. Фиксация материала в р-ре цинк-этанол-формальдегида. Ув.: $\times 400$.

Fig. 2. Mediastinal ganglia of a newborn rat. а — ganglion of the epicardial plexus near the atrium myocardium, б — ganglion between the esophagus and trachea. Н — neurons, Нн — nerve bundle, * — satellite cells of neurons, ↑↑ — neurolemmocytes of the nerve fiber bundle, М — myocardium, Нл — neurolemmocyte cord; Ст — connective tissue, С — blood vessels, ХК — group of chromaffin cells. Immunohistochemical reaction for S100 β protein, staining with toluidine blue. Fixation of the material in a zinc-ethanol-formaldehyde solution. Magn.: $\times 400$.

для астроцитарной глии в межмышечном ганглиозном сплетении пищевода, а также в некоторых нервных стволиках и пучках, где они находятся вместе с нейробластами в состоянии миграции в стенку пищевода. На рис. 3 видны фрагменты сплетения Ауэрбаха, состоящие из тяжей нейробластов, молодых нейронов и нервных волокон. В сплетениях видны также астроцитоподобные клеточные элементы. Их GFAP⁺ удлинённые тела и отростки, окрашенные в тёмно-коричневый цвет и собранные в виде обособленных мелких пучков, чётко выделяются среди общей массы нервно-волокнистых структур (рис. 3б, в). Подобные картины встречаются также внутри нейро-клеточных тяжей и пучков, расположенных в соединительной ткани, вблизи пищевода и бронхов (рис. 2). На рис. 3б видно, что пучки астроцитоподобных клеток тесно связаны с прилежащими к ним островками нейробластов (рис. 3а, б).

Обращает на себя внимание неравномерность концентрации нервных структур

в средостении у новорождённых. Наиболее чётко скопление нервных структур (нервных сплетений и ганглиев) определяется даже при малых увеличениях ($\times 40$), в правом предсердии, в области проводящего миокарда венозного синуса, а точнее — в синусном узле. В остальных местах предсердий встречаются лишь редкие тонкие терминальные разветвления нервных волокон, при этом в миокарде левого предсердия, а также желудочков они практически отсутствуют (рис. 4). В адвентиции стенок аорты, лёгочных артерий, полых и лёгочных вен, в тканях лёгких, формирующихся лимфатических узлах иннервация менее выражена по сравнению с пищеводом и главными бронхами.

Обсуждение результатов

Начиная с прошлого столетия, известна классификация глии периферической нервной системы (ПНС). Большой вклад в биологию развития нейроглиальных тканей был внесён отечественными учё-

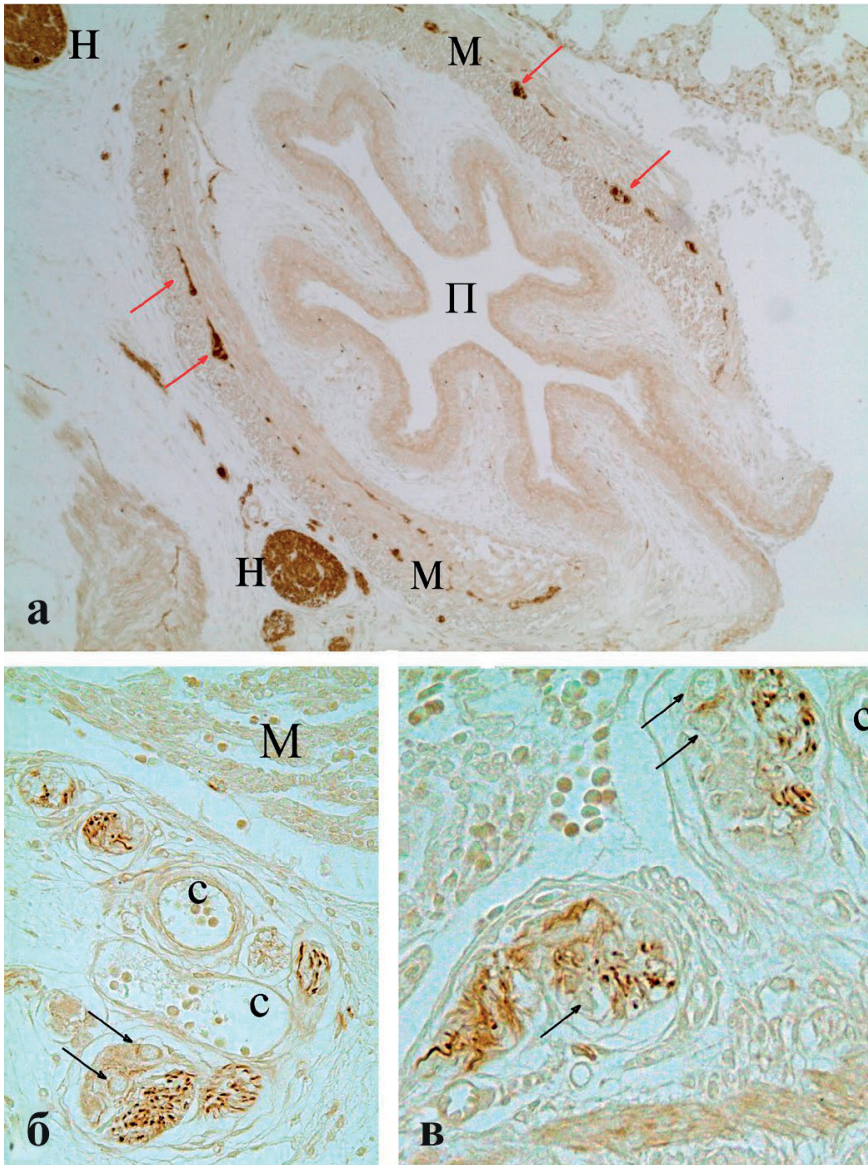


Рис. 3. Фрагменты пищевода новорождённой крысы: а — общий вид; б, в — нервные и глиальные элементы, мигрирующие по нервным стволикам в стенку пищевода, и тяжи нейробластов в соединительной ткани на границе между пищеводом и трахеей. П — полость пищевода; М — мышечный слой стенки пищевода; Н — нервные пучки; ↑↑ — ганглии ауэрбахова сплетения; ↑↑ — нейробласты; С — кровеносные сосуды. Иммуногистохимические реакции на PGP 9.5 (а), GFAP (б, в). Фиксация материала в р-ре цинк-этанол-формальдегида. Ув.: ×100 (а), ×400 (б, в).

Fig. 3. Fragments of the esophagus of a newborn rat: а — general view; б, в — nerve and glial elements migrating along the nerve trunks into the wall of the esophagus and neuroblast in the connective tissue at the border between the esophagus and trachea. П — esophageal cavity; М — muscle layer of the esophageal wall; Н — nerve bundles; ↑↑ — ganglia of Auerbach's plexus; ↑↑ — neuroblasts; С — blood vessels. Immunohistochemical reactions to PGP 9.5 (а), GFAP (б, в). Fixation of the material in a zinc-ethanol-formaldehyde solution. Magn.: ×100 (а), ×400 (б, в).

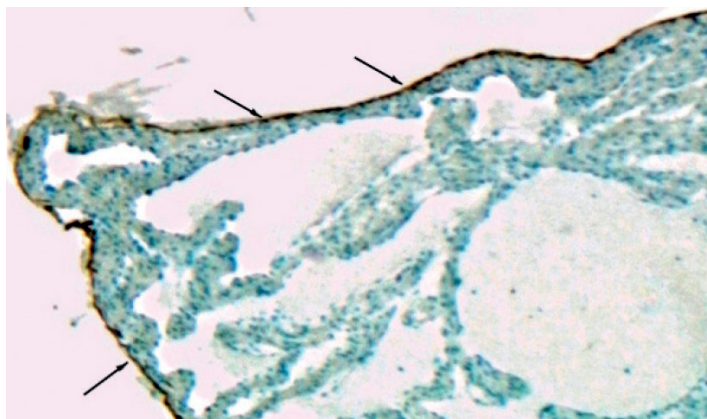


Рис. 4. Отсутствие нервных структур в ушке левого предсердия новорождённой крысы. Иммуногистохимическая реакция на белок PGP 9.5. ↑↑ — проэпикард. Подкраска толуидиновым синим. Фиксация материала в р-ре цинк-этанол-формальдегида. Ув.: ×400.

Fig. 4. Absence of nerve structures in the left atrial appendage of a newborn rat. Immunohistochemical reaction to PGP 9.5 protein. ↑↑ — proepicardium. Toluidine blue. Fixation of the material in a zinc-ethanol-formaldehyde solution. Magn.: ×400.

ными Н.Г. Хлопиным, А.А. Заварзиным, А.Г. Кнорре, В.П. Михайловым [1, 3, 8, 13]. В классификацию глиальной ткани к настоящему времени внесены уточнения [2, 11, 14]. К глии ПНС относят миелинообразующие и немиелинизирующие шванновские клетки или нейролеммоциты периферических нервов, их стволов, пучков нервных сплетений, сателлитную глию нейронов интрамуральных ганглиев, интерстициальные клетки Кахаля и вспомогательные клетки сенсорных органов или рецепторов [27–29, 31].

Имеются данные о наличии нескольких типов глии в метасимпатической или энтеральной нервной системе (ЭНС) [16, 23, 25] и в лёгких некоторых позвоночных животных [32]. В литературе имеются оригинальные данные об относительно морфофункциональной характеристике метасимпатического или энтерального, в отличие от парасимпатического и симпатического, отделов ПНС [9]. На сегодня известно, что ЭНС по многим характеристикам является образованием, аналогичным мозгу ЦНС позвоночных животных, — первичным мозгом брюшной цепочки коль-

чатых червей [21]. Выяснилось, что в нём имеется два типа глии: астроцитоподобная, сходная с глией ЦНС, и шванновские клетки или нейролеммоциты АНС [16, 24, 25].

В предыдущей нашей работе, посвящённой иннервации толстого кишечника, в ауэрбаховом ганглиозном сплетении кишечной стенки человека и животных обнаружены только два типа глиальных клеток: астроцитоподобные, сходные с глией ЦНС, и шванновские клетки или нейролеммоциты, сходные с ПНС [16]. Оба типа глиальных тканей отличаются по клеточному строению, морфологическим особенностям, функциям, антигенным признакам и происхождению. По данным последних двух десятилетий, глия разных отделов ПНС развивается из разных источников (краниального, туловищного и крестцового нервных гребней) [25].

До недавнего времени функции нейроглии связывали в основном с поддержанием и обеспечением жизнедеятельности нейронов. Сегодня доказано, что нейроглия как позвоночных, так и беспозвоночных животных является многофункциональной

клеточной популяцией, её изучению уделяется большое внимание нейробиологов [12, 16, 19, 20]. Продолжают изучаться морфологические и функциональные особенности глии всех отделов ЦНС животных и человека, уточняется их классификация [14, 33]. Малоизученными остаются вопросы происхождения, развития и дифференцировки нейроглии в различных системах органов и тканей. Выясняется её роль при различных заболеваниях животных и человека.

В последние годы уделяется большое внимание глиальным тканям центральной, периферической и энтеральной нервных систем, пересматриваются взгляды на их происхождение, строение, функции. При этом бóльший интерес исторически отводится нейроглии ЦНС (астроцитам, олигодендроцитам и микроглии), чем глии ПНС [10, 14, 16, 26].

Вопросы об иннервации органов грудной клетки, о морфологических особенностях и расположении ганглиев, медиаторном статусе их нейронов, о типах глии, локализуемой в органах сердечно-сосудистой, дыхательной и пищеварительной систем животных и человека, мало изучены и обсуждаются лишь в отдельных обзорах [26]. Следует отметить, что данные о морфологии, развитии, происхождении и функциях глии в средостении отсутствуют. В результате настоящего исследования с применением ИГХ-методов мы обнаружили в ЭНС пищевода GFAP⁺ астроцитоподобные клетки и несколько разновидностей S100β⁺ нейролеммоцитов. Ранее они были описаны нами в стенке кишки взрослых животных и человека при патологии [16]. Это согласуется с данными других исследователей [24, 25]. Две разновидности глии, обнаруженные нами в средостении у новорождённых крыс в процессе миграции их клеточных элементов в стенку пищевода, также подтверждают эти наблюдения. GFAP⁺ плотные тяжи, состоящие из сильно удлинённых тел и отростков астроцитоподобных элементов,

и тяжи иммунонегативных к данному маркёру нейробластов были выявлены в нервных стволиках и пучках, направляющихся в межмышечную стенку пищевода, в места расположения формирующегося ганглиозного сплетения Ауэрбаха.

В настоящей работе показано, что нейроглиальные взаимоотношения уже достаточно хорошо выражены у новорождённых крыс. Глиальные клетки шванновского типа (в виде сегментов длиной от 50 до 200 мкм) обнаружены в пучках миелинизированных аксонов вагусного ствола, многочисленные веретеновидной формы нейролеммоциты немиелинизированных аксонов выявляются в стволах и пучках парасимпатических и симпатических нервных сплетений, одиночные клетки-сателлиты — вблизи и вокруг тел нейробластов и молодых нейронов ганглиев аортально-пульмональной области сердца и бронхов. Специализированную популяцию клеток отростчатой формы — нейролеммоцитов, которые некоторые авторы называют «клетками Кахаля» (interstitial cell of Cajal) [23], составляют элементы терминальных узкопетлистых сетей из волокон Ремака. Они представляют собой синцитиоподобные сети из цитоплазматических отростков нейролеммоцитов с заключёнными в них пакетами тончайших варикозных аксонов (от 10 до 50 и более), выполняющих функции дистантных синапсов (*en passant*). По мнению Б.И. Лаврентьева (1983), J.V. Furness и M.J. Stebbing (2018), «клетки Кахаля» участвуют в иннервации, главным образом, гладкой мышечной ткани стенок кишечного тракта, кровеносных сосудов, мочевого пузыря и др. [6, 21]. Этот тип нейроглиальных синаптических взаимоотношений в нашей работе обнаружен впервые с помощью применения ИГХ-методов в проводящем миокарде синусного узла и пучках Гиса, а также внутри формирующихся долек жировой ткани средостения с первых дней после рождения [17].

На основании анализа литературы и полученных фактов собственных наблюдений можно высказать предположение о нескольких источниках образования глии в средостении. S100β⁺ клетки нейролеммоцитарного ряда могут происходить из разных отделов мезодермы (париетального и висцерального листков): одни — из клеток эктомезенхимы нервного гребня вагусного нерва ЭНС; другие — из эктомезенхимы нервной трубки, на уровне спинного мозга (нейролеммоциты спинномозговых нервов).

Что касается астроцитоподобной глии средостения, клеточные элементы этой глии были нами обнаружены с помощью ИГХ-реакции на белок GFAP только в ауэрбаховом ганглиозном сплетении пищевода; в мейсснеровом сплетении они отсутствуют. Известно, что предшественники этой глии мигрируют в стенку кишки из нервного гребня (на уровне вагусного нерва) вместе с нейробластами, и, по нашему мнению, с леммобластами — предшественниками нейролеммоцитов ПНС. В настоящей работе морфологические признаки миграции и заселения нейроглиальных тяжей в стенку пищевода нам удалось обнаружить на стадии P1. Эти наблюдения подтверждают данные о том, что процессы гистогенеза и органогенеза продолжаются

в ЖКТ крысы и после рождения. Дискуссия на эту тему продолжает быть актуальной в литературе.

Закключение

С помощью применения глиальных иммуногистохимических маркеров (GFAP и белка S100β) в нервных структурах средостения выявлены два типа клеток: астроцитоподобные клетки с признаками глии ЦНС в стенке пищевода и нейролеммоциты, свойственные ПНС. Среди нейролеммоцитов в средостении выделены популяции: миелинообразующие шванновские клетки, нейролеммоциты немиелинизированных нервных волокон, нейролеммоциты пучков Ремака основного терминального синаптического сплетения, а также сателлитные или капсульные клетки нейроцитов интрамуральных ганглиев. Учитывая современное представление о значении глии для функционирования жизненно важных органов в норме, а также её влияние на сохранение целостности нервных структур при патологии, результаты настоящего исследования важны для проведения биомедицинских исследований по разработке новых способов терапии, направленных на изменение функционального статуса глиальных клеток, в будущем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Заварзин А.А. *Очерки по эволюционной гистологии нервной системы. Избранные труды. Т. III*. М.: Изд-во Акад. наук СССР, 1950. [Zavarzin A.A. *Ocherki po evolyutsionnoy gistologii nervnoy sistemy. Izbrannye trudy. T. III [Essays on the evolutionary histology of the nervous system. Selected works. Vol. III]*. Moscow: Izd-vo Akad. nauk SSSR, 1950. (In Russian)].
2. Клишов А.А. *Гистогенез и регенерация тканей*. Л.: Медицина, 1984. [Klishov A.A. *Gistogenez i regeneratsiya tkaney [Histogenesis and tissue regeneration]*. Leningrad: Meditsina Publ., 1984. (In Russian)].
3. Кнорре А.Г. *Эмбриональный гистогенез*. Л.: Медицина, 1971. [Knorre A.G. *Embrional'nyy gistogenez [Embryonic histogenesis]*. Leningrad: Meditsina Publ., 1971. (In Russian)].
4. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Петрова Е.С., Карпенко М.Н., Григорьев И.П., Сухорукова Е.Г., Колос Е.А., Гиляров А.В. *Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии (руководство)*. СПб.: СпецЛит, 2014. [Korzhevskiy D.E., Kirik O.V., Petrova E.S., Karpenko M.N., Grigoriev I.P., Sukhorukova E.G., Kolos E.A., Gilyarov A.V. *Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primeneniye metodov immunogistokhimii (rukovodstvo) [Theoretical foundations and practical application of immunohistochemistry methods (guide)]*. Saint Petersburg: SpetsLit Publ., 2014. (In Russian)].
5. Куприянов В.В. *Морфологические закономерности периферической иннервации*. Кишинёв: Мин-во здравоохранения МССР, 1958. [Kupriyanov V.V. *Morfologicheskie zakonomernosti perifericheskoy innervatsii [Morphological patterns of peripheral innervations]*. Kishinev: Min-vo zdravookhraneniya MSSR, 1958. (In Russian)].

6. Лаврентьев Б.И. *Теория строения вегетативной нервной системы (сб. трудов)*. М.: Медицина, 1983. [Lavrentyev B.I. *Teoriya stroeniya vegetativnoy nervnoy sistemy (sb. trudov)* [The theory of the structure of the autonomic nervous system (collection of works)]. Moscow: Meditsina Publ., 1983. (In Russian)].
7. Лашков В.Ф. *Иннервация органов дыхания*. М.: Изд-во мед. лит-ры, 1963. [Lashkov V.F. *Innervatsiya organov dykhaniya* [Innervation of the respiratory organs]. Moscow: Izd-vo med. lit-ry, 1963. (In Russian)].
8. Михайлов В.П. Генетическая система тканей и их иерархическая таксономия. В кн.: *Тканевая биология*. Тарту: Изд-во ТГУ, 1980:3–14. [Mikhaylov V.P. Geneticheskaya sistema tkaney i ikh ierarkhicheskaya taksonomiya [Genetic system of tissues and their hierarchical taxonomy]. V kn.: *Tkanevaya biologiya* [In: *Tissue biology*]. Tartu: Izd-vo TGU, 1980:3–14. (In Russian)].
9. Ноздрачев А.Д. *Физиология вегетативной нервной системы*. Минск: Медицина, 1983. [Nozdrachev A.D. *Fiziologiya vegetativnoy nervnoy sistemy* [Physiology of the autonomic nervous system]. Minsk: Meditsina Publ., 1983. (In Russian)].
10. Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И. *Периферическая нервная система*. СПб.: Наука, 1999. [Nozdrachev A.D., Chumasov E.I. *Perifericheskaya nervnaya sistema* [Peripheral nervous system]. Saint Petersburg: Nauka Publ., 1999. (In Russian)].
11. Одицова И.А., Данилов Р.К. Учение о тканях — основа гистологии как триединой учебной и научной дисциплины. В кн.: *Вопросы морфологии XXI века*. СПб.: Изд-во ДЕАН, 2021:17–25. [Odintsova I.A., Danilov R.K. Uchenie o tkanyakh — osnova gistologii kak triedinoy uchebnoy i nauchnoy distsipliny [The study of tissues is the basis of histology as a triune educational and scientific discipline]. V kn.: *Voprosy morfologii XXI veka* [In: *Morphology issues of the 21st century*]. Saint Petersburg: Izd-vo DEAN, 2021:17–25. (In Russian)].
12. Хачатрян А.А., Ерофеева Л.М., Кутвицкая С.А. Роль нейроглии в функционировании нервной системы. *Успехи современного естествознания*. 2014;6:66–70. [Khachatryan A.A., Erofeeva L.M., Kutvitskaya S.A. Rol' neyroglii v funktsionirovaniy nervnoy sistemy [The role of neuroglia in the functioning of the nervous system]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* [Advances in Current Natural Sciences]. 2014;6:66–70. (In Russian)].
13. Хлопин Н.Г. *Общегистологические и экспериментальные основы гистологии*. М.: Медицина, 1946. [Khlopin N.G. *Obshchegistologicheskie i eksperimental'nye osnovy gistologii* [General histological and experimental fundamentals of histology]. Moscow: Meditsina Publ., 1946. (In Russian)].
14. Чумасов Е.И. К вопросу о классификации тканей нервной системы позвоночных животных. *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2015;4:224–230. [Chumasov E.I. K voprosu o klassifikatsii tkaney nervnoy sistemy pozvonochnykh zhivotnykh [On the issue of classification of tissues of the nervous system of vertebrates]. *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii* [Issues of legal regulation in veterinary medicine]. 2015;4:224–230. (In Russian)].
15. Чумасов Е.И., Колос Е.А., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. *Иммуногистохимия периферической нервной системы*. СПб.: СпецЛит, 2020. [Chumasov E.I., Kolos E.A., Petrova E.S., Korzhevskiy D.E. *Immunogistokhimiya perifericheskoy nervnoy sistemy* [Immunohistochemistry of the peripheral nervous system]. Saint Petersburg: SpetsLit Publ., 2020. (In Russian)].
16. Чумасов Е.И., Майстренко Н.А., Ромашенко П.Н., Самедов В.Б., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Патологические изменения глиальных клеток в энтеральной нервной системе толстой кишки при хроническом медленно-транзитном запоре. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(6):191–202. [Chumasov E.I., Maystrenko N.A., Romashchenko P.N., Samedov V.B., Petrova E.S., Korzhevskiy D.E. Patologicheskie izmeneniya glial'nykh kletok v enteral'noy nervnoy sisteme tolstoy kishki pri khronicheskom medlenno-tranzitnom zapore [Pathological changes in glial cells in the enteric nervous system of the colon during chronic transitory constipation]. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal* [Siberian Scientific Medical Journal]. 2023;43(6):191–202. (In Russian). DOI: 10.18699/SSMJ20230624
17. Чумасов Е.И., Петрова Е.С. Нервные структуры органов средостения новорожденной крысы. *Морфология*. 2023;161(4):23–32. [Chumasov E.I., Petrova E.S. Nervnye struktury organov sredosteniya novorozhdennoy krysy [Nervous structures of the mediastinal organs of the newborn rat]. *Morfologiya* [Morphology]. 2023;161(4):23–32. (In Russian). DOI: 10.17816/morph.629184
18. Швалев В.Н., Сосунов А.А., Гуски Г. *Морфологические основы иннервации сердца*. М.: Наука, 1992. [Shvalev V.N., Sosunov A.A., Guski G. *Morfologicheskie osnovy innervatsii serdtsa* [Morphological basis of heart innervations]. Moscow: Nauka Publ., 1992. (In Russian)].
19. Allen N.J., Barres B.A. Neuroscience: Glia — More than just brain glue. *Nature*. 2009;457(7230):675–677. DOI: 10.1038/457675a
20. Barres B.A. The mystery and magic of glia: A perspective on their roles in health and disease. *Neuron*. 2008;60(3):430–440. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.10.013
21. Furness J.B., Stebbing M.J. The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. *Neurogastroenterol. Motil*. 2018;30(2). DOI: 10.1111/nmo.13234
22. Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Modern imaging technologies of mast cells for biology and medicine (review). *Modern Tehnologies Med*. 2021;13(4):93–109. DOI: 10.17691/stm2021.13.4.10
23. Grundmann D., Loris E., Maas-Omlor S., Huang W., Scheller A., Kirchoff F., Schäfer K.H. Enteric glia: S100, GFAP, and beyond. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2019;302(8):1333–1344. DOI: 10.1002/ar.24128

24. Gulbransen B.D., Sharkey K.A. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012;9(11):625–632. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.138
25. Pawolowski V., Schmidt M.H.H. Neuron-glia interaction in the developing and adult enteric nervous system. *Cells.* 2020;10(1):47. DOI: 10.3390/cells10010047
26. Reed C.B., Feltri M.L., Wilson E.R. Peripheral glia diversity. *J. Anat.* 2022;241(5):1219–1234. DOI: 10.1111/joa.13484
27. Rumessen J.J., Thuneberg L. Pacemaker cells in the gastrointestinal tract: Interstitial cells of Cajal. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 1996;216:82–94. DOI: 10.3109/00365529609094564
28. Rumessen J.J., Vanderwinden J.M., Horn T. Ulcerative colitis: Ultrastructure of interstitial cells in myenteric plexus. *Ultrastruct. Pathol.* 2010;34(5):279–287. DOI: 10.3109/01913121003770701
29. Rumessen J.J., Vanderwinden J.M., Hansen A., Horn T. Ultrastructure of interstitial cells in subserosa of human colon. *Cells Tissues Organs.* 2013;197(4):322–332. DOI: 10.1159/000346314
30. Saburkina I., Gukauskienė L., Rysevaite K., Brack K.E., Pauza A.G., Pauziene N., Pauza D.H. Morphological pattern of intrinsic nerve plexus distributed on the rabbit heart and interatrial septum. *J. Anat.* 2014;224(5):583–593. DOI: 10.1111/joa.12166
31. Sinegubov A., Andreeva D., Burzak N., Vasyutina M., Murashova L., Dyachuk V. Heterogeneity and potency of peripheral glial cells in embryonic development and adults. *Front. Mol. Neurosci.* 2022;15:737949. DOI: 10.3389/fnmol.2022.737949
32. Suarez-Mier G.B., Buckwalter M.S. Glial fibrillary acidic protein-expressing glia in the mouse lung. *ASN Neuro.* 2015;7(5):1759091415601636. DOI: 10.1177/1759091415601636
33. Verkhratsky A., Ho M.S., Parpura V. Evolution of neuroglia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1175:15–44. DOI: 10.1007/978-981-13-9913-8_2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Чумасов Евгений Иванович*, д.б.н., проф., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»;
e-mail: ua1ct@mail.ru

Evgenii I. Chumasov*, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine;
e-mail: ua1ct@mail.ru

Петрова Елена Сергеевна, к.б.н., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;
e-mail: iemmorphol@yandex.ru

Elena S. Petrova, Cand. Sci. (Biol.), Institute of Experimental Medicine;
e-mail: iemmorphol@yandex.ru

Коржевский Дмитрий Эдуардович, проф. РАН, д.м.н., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»;
e-mail: iemmorphol@yandex.ru

Dmitry E. Korzhevskii, Prof. of the RAS, Dr. Sci. (Med.), Institute of Experimental Medicine;
e-mail: iemmorphol@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ХАРАКТЕРИСТИКА СТРОМАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В МОДЕЛИ ЛУЧЕВОГО ГЕПАТИТА

Г.А. Демяшкин^{1,2,*}, В.А. Якименко², М.А. Вадюхин², Д.И. Угурчиева², С.Н. Корякин¹

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России
249036, Российская Федерация, Московская обл., Обнинск, ул. Королева, 4

² ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет)
119048, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Облучение злокачественных новообразований печени и органов брюшной полости может приводить к развитию лучевого гепатита и печёночной недостаточности. Кроме того, острая воспалительная реакция стимулирует коллагеногенез, что вызывает радиационно-индуцированный фиброз. Интересным представляется исследование протекторных свойств аскорбиновой кислоты, которая является доказанным антиоксидантом и потенциально может снизить степень радиационно-индуцированного фиброза печени. Цель исследования – оценка степени радиационно-индуцированного фиброза печени в модели хронического лучевого гепатита и на фоне введения аскорбиновой кислоты. Крысы популяции линий Wistar (n=40) были поделены на четыре экспериментальные группы: I — контрольная (n=10); II — облучение электронами (n=10); III — введение аскорбиновой кислоты перед облучением электронами (n=10); IV — введение аскорбиновой кислоты (n=10). Животных всех групп (I–IV) выводили из эксперимента через 3 мес. после последней фракции. Проводили гистологическое исследование фрагментов печени и гистохимическое окрашивание по Массону. При гистохимическом окрашивании фрагментов печени по Массону на третьем месяце эксперимента обнаружили, что площадь коллагеновых и ретикулярных волокон, окрашенных анилиновым синим, практически сохраняла контрольные значения в группе введения аскорбиновой кислоты перед воздействием электронами, в то время как в группе облучения отмечали разрастание стромального компонента на фоне признаков лучевого гепатита. Введение аскорбиновой кислоты перед воздействием фракционного локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр (модель лучевого гепатита) приводит к замедлению развития и снижению степени выраженности радиационно-индуцированного фиброза печени на третьем месяце эксперимента.

Ключевые слова: фиброз, электроны, печень, аскорбиновая кислота, гистохимия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Демяшкин Г.А., Якименко В.А., Вадюхин М.А., Угурчиева Д.И., Корякин С.Н. Характеристика стромального компонента печени после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита. *Биомедицина*. 2024;20(4):70–77. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-70-77>

Поступила 24.03.2024

Принята после доработки 29.06.2024

Опубликована 10.12.2024

CHARACTERISTICS OF THE FIBROUS COMPONENT OF THE LIVER AFTER ADMINISTRATION OF ASCORBIC ACID IN A RADIATION HEPATITIS MODEL

Grigory A. Demyashkin^{1,2,*}, Vladislav A. Yakimenko², Matvey A. Vadyukhin²,
Dali I. Ugurchieva², Sergey N. Koryakin¹

¹ Medical Radiological Research Center named after A.F. Tsyba — Branch of the National Medical
Research Center of Radiology
249036, Russian Federation, Moscow Region, Obninsk, Koroleva Str., 4

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry
of Health Care of Russia (Sechenov University)
119048, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8, building 2

Irradiation of malignant neoplasms of the liver and abdominal organs can lead to the development of radiation hepatitis and liver failure. In addition, the acute inflammatory response stimulates collagenogenesis, which causes radiation-induced fibrosis. It appears promising to study the protective properties of ascorbic acid, which is a proven antioxidant capable of reducing the degree of radiation-induced liver fibrosis. In this study, we aim to assess the degree of radiation-induced liver fibrosis both in a model of chronic radiation hepatitis and against the background of administration of ascorbic acid. Wistar rats (n=40) were divided into four experimental groups: I – control (n=10); II – electron irradiation (n=10); III – administration of ascorbic acid before electron irradiation (n=10); IV – administration of ascorbic acid (n=10). Animals of all groups (I–IV) were removed from the experiment three months after the last fraction. A histological examination of liver fragments and histochemical staining according to Masson were performed. When performing histochemical staining of liver fragments according to Masson in the third month of the experiment, it was found that the area of collagen and reticular fibers stained with aniline blue practically retained control values in the group of pre-irradiation administration of ascorbic acid. For comparison, in the group of electron irradiation, a proliferation of the fibrous component was noted against the background of radiation hepatitis signs. Pre-irradiation administration of ascorbic acid slows down the development and decrease the severity of radiation-induced liver fibrosis three months after fractional local irradiation with electrons at a total dose of 30 Gy (in a model of radiation hepatitis).

Keywords: fibrosis, electrons, liver, ascorbic acid, histochemistry

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

For citation: Demyashkin G.A., Yakimenko V.A., Vadyukhin M.A., Ugurchieva D.I., Koryakin S.N. Characteristics of the Fibrous Component of the Liver after Administration of Ascorbic Acid in a Radiation Hepatitis Model. *Journal Biomed.* 2024;20(4):70–77. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-70-77>

Submitted 24.03.2024

Revised 29.06.2024

Published 10.12.2024

Введение

X- и γ -облучение злокачественных новообразований печени и органов брюшной полости может приводить к таким необратимым изменениям гистоархитектоники печени, как проявление лучевого гепатита вплоть до острой или хронической печёночной недостаточности [17]. Ряд авторов

отмечали, что после воздействия ионизирующего излучения (как X-, так и γ -лучей) уже на ранних сроках происходит гибель гепатоцитов путём апоптоза, отёк интерстициальной ткани, кровоизлияния в паренхиму органа и др. [1].

Опубликованы данные о том, что локальная воспалительная реакция впослед-

ствии стимулирует коллагенообразование во многих органах и тканях, что вызывает радиационно-индуцированный фиброз [4, 11, 18]. Существуют единичные работы, в которых описано развитие фиброза печени через 3 мес. после воздействия ионизирующего излучения, даже в дозе менее 30 Гр [12]. Однако данные о точных сроках и механизмах его развития при воздействии X-, γ - и других видов облучения в печени остаются противоречивыми и малоизученными. В последнее время в лучевую терапию злокачественных новообразований печени активно внедряется облучение электронами, которое характеризуется более «щадящим» влиянием на здоровые ткани [5], поэтому исследование пострадиационных эффектов этого вида ионизирующего излучения (в т. ч. фибрирования) в печени остаётся особенно актуальным.

Не менее важным является проведение исследований, посвящённых разработке способов нивелирования пострадиационных эффектов в различных органах. Многообещающим протекторным субстратом является аскорбиновая кислота, обладающая доказанными антиоксидантными свойствами [7, 8], которая потенциально способна снизить степень радиационно-индуцированного фиброза печени.

Цель исследования — оценка степени радиационно-индуцированного фиброза печени в модели хронического лучевого гепатита и на фоне введения аскорбиновой кислоты.

Материалы и методы

В исследовании использовали самцов крыс инбредной популяции линий Wistar ($n=40$; возраст 8–9 недель; масса тела 220 ± 20 г), полученных и содержащихся в виварии Института трансляционной медицины и биотехнологии Сеченовского Университета. Они были поделены на четыре экспериментальные группы: I группа

($n=10$) — контрольная; II группа ($n=10$) — фракционное локальное облучение электронами в суммарной очаговой дозе (СОД) 30 Гр; III группа ($n=10$) — интраперитонеальное введение аскорбиновой кислоты в дозе 50 мг/кг за 1 ч до локального облучения электронами в СОД 30 Гр; IV группа ($n=10$) — интраперитонеальное введение аскорбиновой кислоты в дозе 50 мг/кг.

Животных всех групп выводили из эксперимента путём введения высоких доз анестетика через 3 мес. после последней фракции. Все манипуляции выполняли согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ЕЭС, Страсбург, 1985). Проведение исследования одобрено протоколом Локального этического комитета МРНЦ им. А.Ф. Цыба.

Морфологическое исследование. После извлечения фрагменты печени фиксировали в р-ре забуференного формалина, после проводки в автоматическом режиме заливали в парафиновые блоки, готовили серийные срезы (толщиной 2 мкм), депарафинировали, дегидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином.

По одному препарату окрашивали с использованием гистохимического метода по Массону для оценки стромального компонента печени. Морфометрическую оценку после гистохимического окрашивания по Массону переводили в баллы, учитывая площадь и оптическую плотность (хромогенность) в относительных единицах: 1 — слабое (0–0,3); 2 — умеренное (0,3–0,6); 3 — выраженное ($>0,6$).

Морфологический анализ проводили в десяти случайно выбранных полях зрения микроскопа при увеличении $\times 400$ в пяти случайных срезах с каждого образца. Цифровые изображения гистологических срезов (отсканированные препараты) для морфометрических исследований полу-

чали с помощью системы видео-микроскопии (микроскоп «Leica DM3000», Германия; камера «Leica DFC450 C», Германия; компьютер «Platrun LG», Южная Корея) и программного обеспечения для обработки и анализа изображений Leica Application Suite (LAS) Version 4.9.0 (Германия).

Статистический анализ. Полученные в результате подсчёта данные площади гистохимического окрашивания и оптической плотности стромального компонента обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 12 for Windows («IBM Analytics», США).

Результаты исследований

Во фрагментах печени (рис.) контрольной и IV групп наблюдали нормальное гистологическое строение паренхимы: радиально отходящие от центральной вены печёночные балки, между которыми определяются синусоиды с клетками Купфера; полигональной формы гепатоциты (с крупным ядром в центре).

Через 3 мес. после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр наблюдали умеренное разрастание стромального компонента, фокальную атрофию 1/6 части печёночных долек, единичные мононуклеарные воспалительные клетки. Местами отмечали гиперплазию клеток Купфера, расширение синусоидов, утолщение стенки желчных протоков.

В группе введения аскорбиновой кислоты перед облучением электронами на 3-м мес. эксперимента обнаружили слабое разрастание стромального компонента печени с фокальной атрофией гепатоцитов в единичных образцах, воспалительные клетки отсутствовали.

Гистохимическое исследование фрагментов печени по Массону через 3 мес. после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр демонстрировало умеренное разрастание стромального компонента, подтверждённое увеличением площади окрашивания коллагеновых волокон анилиновым синим и хромогенности (3

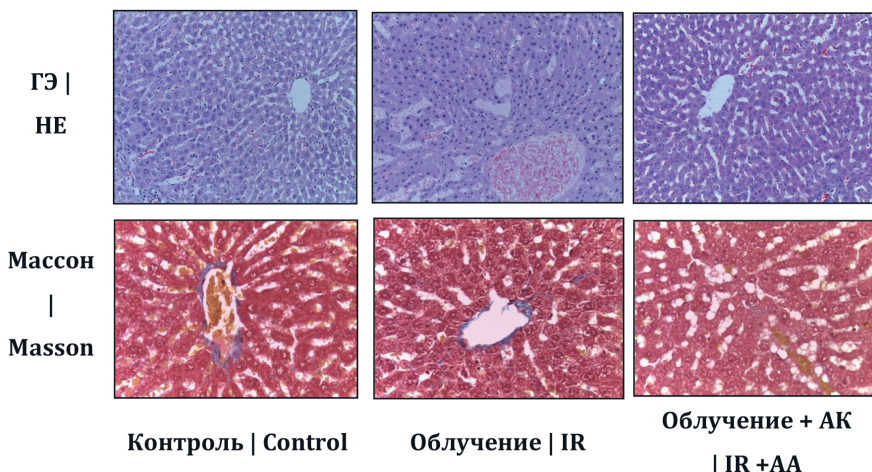


Рис. Фрагменты печени контрольной и опытных групп на 3-м мес. эксперимента. Морфологическое (окрашивание гематоксилином и эозином) и гистохимическое (окрашивание трихромом по Массону) исследования, ув. $\times 400$. ГЭ — окрашивание гематоксилином и эозином, IR — ионизирующее облучение, АК — аскорбиновая кислота.

Fig. Liver fragments of the control and experimental groups in the third month of the experiment. Morphological (hematoxylin and eosin stain) and histochemical (Masson trichrome stain) studies, magn. $\times 400$. ГЭ — hematoxylin and eosin staining, IR — ionizing radiation, АК — ascorbic acid.

балла), располагающихся преимущественно в перисинусоидном и междольковом пространствах.

Напротив, на 3-м мес. эксперимента площадь коллагеновых и ретикулярных волокон, окрашенных анилиновым синим, была приближена к контрольным значениям (1 балл) в образцах печени группы введения аскорбиновой кислоты перед воздействием электронами по сравнению с группой фракционного облучения в суммарной дозе 30 Гр. В перисинусоидном и междольковом пространствах отмечали диффузное окрашивание единичных пучков рыхлой волокнистой соединительной ткани.

Гистохимическая картина в образцах IV группы визуально не отличалась от таковой в контрольной группе (1 балл).

Обсуждение результатов

Настоящее исследование посвящено оценке степени радиационно-индуцированного фиброза печени на фоне введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита.

Воздействие ионизирующего излучения на ранних сроках приводит к гибели гепатоцитов преимущественно путём апоптоза, запускаемого как прямым повреждением заряженными частицами молекулы ДНК, так и косвенно, посредством генерации токсичных свободных радикалов и оксидативного стресса [19]. В ответ на это синтезируется большое количество цитокинов, активирующих иммунный ответ (привлечение макрофагов для утилизации фрагментов погибших клеток) [20], и факторов репарации, включающих в себя профибротические биологически активные вещества, такие как TGF- β , IL-1 β , IL-6 и др. Кроме того, генерация активных форм кислорода и азота индуцирует систему антиоксидантной защиты (активация систем супероксиддисмутаз, пероксидазы, каталазы, тиоредоксина, пероксиредоксина, глутатиона и др.) [10, 14],

действие которой лимитировано и чаще всего не может обеспечить полного связывания токсических молекул. Перечисленные молекулярные механизмы в сочетании с декомпенсацией оксидативного стресса приводят к развитию острого лучевого гепатита, который, в ряде случаев, способен к хронизации с постоянной персистенцией перечисленных факторов, хроническим воспалением и исходом в радиационно-индуцированный фиброз печени [9].

Данное состояние характеризуется перестройкой гистоархитектоники печени в связи с усилением синтеза коллагена и разрастанием коллагеновых волокон. Это было обнаружено в нашем исследовании при гистохимических реакциях трихромом по Массону после воздействия электронами СОД 30 Гр: умеренное окрашивание анилиновым синим коллагеновых и ретикулярных волокон в перисинусоидном и междольковых пространствах. Вероятно, локализацию обнаруженных изменений можно объяснить близостью данных участков печёночной паренхимы к кровеносным сосудам, т. к. именно через кровеносное русло происходит движение и паракринное действие профибротических факторов, а также миграция иммунокомпетентных клеток в печень [15]. Под действием этих факторов происходит активация Nf- κ B- и TGF- β -сигнальных путей, ответственных за коллагенообразование и развитие радиационно-индуцированного фиброза печени в отдалённые сроки после облучения электронами.

Не исключена роль клеток Купфера (их гиперплазия была выявлена нами во II группе), которые, по мнению некоторых авторов, являются одними из ключевых участников хронической воспалительной реакции в печени [9, 12].

Ввиду невозможности медикаментозной коррекции повреждений генетического материала основная роль в контексте защиты здоровых тканей от воздействия ионизиру-

ющего излучения отводится антиоксидантным препаратам, способным связывать свободные радикалы кислорода и азота, таким образом предотвращая развитие оксидативного стресса, гибель гепатоцитов, развитие воспалительной реакции, и, наконец, радиационно-индуцированного фиброза печени [13, 16].

Одним из многообещающих субстратов, обладающих доказанной антиоксидантной активностью, является аскорбиновая кислота [2, 3]. В нашем исследовании её профилактическое применение (введение протектора перед облучением) демонстрировало развитие фиброза печени слабой степени выраженности (практически аналогичный контрольной группе) по сравнению с группой фракционного облучения электронами в СОД 30 Гр. Это подтверждает мнение об антиоксидантной активности аскорбиновой кислоты и может свидетельствовать о протективном эффекте этого препарата в отношении радиационного

повреждения гепатоцитов. Некоторые авторы предполагают, что подобное действие может быть связано не только с возможностью связывания токсичных радикалов кислорода и азота, но и со способностью к стимуляции ферментов эндогенной антиоксидантной защиты [6]. Однако точные механизмы положительного эффекта аскорбиновой кислоты при воздействии облучения электронами остаются малоизученными и требуют проведения новых молекулярно-биологических и молекулярно-генетических исследований.

Выводы

Введение аскорбиновой кислоты перед воздействием фракционного локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр (модель лучевого гепатита) приводит к замедлению развития и снижению степени выраженности радиационно-индуцированного фиброза печени на третьем месяце эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Abdel-Aziz N., Haroun R.A., Mohamed H.E. Low-dose gamma radiation modulates liver and testis tissues response to acute whole body irradiation. *Dose Response*. 2022;20(2):15593258221092365. DOI: 10.1177/15593258221092365
2. Abdulkhaleq F.M., Alhussainy T.M., Badr M.M., Khalil A.A.A., Gammoh O., Ghanim B.Y., Qinna N.A. Antioxidative stress effects of vitamins C, E, and B₁₂, and their combination can protect the liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Drug Des. Devel. Ther*. 2018;12:3525–3533. DOI: 10.2147/DDDT.S172487
3. Abdulrazzaq A.M., Badr M., Gammoh O., Abu Khalil A.A., Ghanim B.Y., Alhussainy T.M., Qinna N.A. Hepatoprotective actions of ascorbic acid, alpha lipoic acid and silymarin or their combination against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(5):181. DOI: 10.3390/medicina55050181
4. Demyashkin G., Shapovalova Y., Marukyan A., Vadyukhin M., Alieva L., Guseynova N., Koryakin S., Filimonova M., Shegay P., Kaprin A. Immunohistochemical and histochemical analysis of the rat skin after local electron irradiation. *Open Vet. J*. 2023;13(12):1570–1582. DOI: 10.5455/OVJ.2023.v13.i12.7
5. Demyashkin G.A., Vadyukhin M.A., Shekin V.I. The influence of platelet-derived growth factors on the proliferation of germinal epithelium after local irradiation with electrons. *J. Reprod. Infertil*. 2023;24(2):94–100. DOI: 10.18502/jri.v24i2.12494
6. Moke E.G., Anachuna K.K., Onyilo P.O., Emosivbe M. Vitamin C in-vivo effect on liver enzymes and some endogenous antioxidants in paracetamol-induced model of liver toxicity on Wistar rats. *J. Appl. Sci. Environ. Manage*. 2019;23(7):1323–1327. DOI: 10.4314/jasem.v23i7.20
7. Gęgotek A., Ambrożewicz E., Jastrząb A., Jarocka-Karpowicz I., Skrzydlewska E. Rutin and ascorbic acid cooperation in antioxidant and antiapoptotic effect on human skin keratinocytes and fibroblasts exposed to UVA and UVB radiation. *Arch. Dermatol. Res*. 2019;311(3):203–219. DOI: 10.1007/s00403-019-01898-w
8. Gęgotek A., Skrzydlewska E. Ascorbic acid as antioxidant. *Vitam. Horm*. 2023;121:247–270. DOI: 10.1016/bs.vh.2022.10.008
9. Kim J., Jung Y. Radiation-induced liver disease: Current understanding and future perspectives. *Exp. Mol. Med*. 2017;49(7):e359. DOI: 10.1038/emmm.2017.85

10. Liu R., Bian Y., Liu L., Liu L., Liu X., Ma S. Molecular pathways associated with oxidative stress and their potential applications in radiotherapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2022;49(5):65. DOI: 10.3892/ijmm.2022.5121
11. Liu S.T., Zha K.J., Li P.J., Gao J.B., Zhang Y.G. Protective effect of naringin against radiation-induced heart disease in rats via Sirt1/NF- κ B signaling pathway and endoplasmic reticulum stress. *Chem. Biol. Drug Des.* 2024;103(1):e14453. DOI: 10.1111/cbdd.14453
12. LoBianco F.V., Krager K.J., Carter G.S., Alam S., Yuan Y., Lavoie E.G., Dranoff J.A., Aykin-Burns N. The role of sirtuin 3 in radiation-induced long-term persistent liver injury. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(5):409. DOI: 10.3390/antiox9050409
13. Mashhadi Akbar Boojar M. An overview of the cellular mechanisms of flavonoids radioprotective effects. *Adv. Pharm. Bull.* 2020;10(1):13–19. DOI: 10.15171/apb.2020.002
14. Nakajima T., Ninomiya Y., Neno M. Radiation-induced reactions in the liver — modulation of radiation effects by lifestyle-related factors. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(12):3855. DOI: 10.3390/ijms19123855
15. Nie X., Yu Q., Li L., Yi M., Wu B., Huang Y., Zhang Y., Han H., Yuan X. Kinsenoside protects against radiation-induced liver fibrosis via downregulating connective tissue growth factor through TGF- β 1 signaling. *Front. Pharmacol.* 2022;13:808576. DOI: 10.3389/fphar.2022.808576
16. Yahyapour R., Shabeeb D., Cheki M., Musa A.E., Farhood B., Rezaeyan A., Amini P., Fallah H., Najafi M. Radiation protection and mitigation by natural antioxidants and flavonoids: Implications to radiotherapy and radiation disasters. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2018;11(4):285–304. DOI: 10.2174/1874467211666180619125653
17. Yang W., Shao L., Zhu S., Li H., Zhang X., Ding C., Wu X., Xu R., Yue M., Tang J., Kuang B., Fan G., Zhu Q., Zeng H. Transient inhibition of mTORC1 signaling ameliorates irradiation-induced liver damage. *Front. Physiol.* 2019;10:228. DOI: 10.3389/fphys.2019.00228
18. Yu Z., Xu C., Song B., Zhang S., Chen C., Li C., Zhang S. Tissue fibrosis induced by radiotherapy: Current understanding of the molecular mechanisms, diagnosis and therapeutic advances. *J. Transl. Med.* 2023;21(1):708. DOI: 10.1186/s12967-023-04554-0
19. Zhu W., Zhang X., Yu M., Lin B., Yu C. Radiation-induced liver injury and hepatocyte senescence. *Cell Death Discov.* 2021;7:244. DOI: 10.1038/s41420-021-00634-6
20. Zhou Y.J., Tang Y., Liu S.J., Zeng P.H., Qu L., Jing Q.C., Yin W.J. Radiation-induced liver disease: Beyond DNA damage. *Cell Cycle.* 2023;22(5):506–526. DOI: 10.1080/15384101.2022.2131163

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Демяшкин Григорий Александрович*, д.м.н., Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: dr.dga@mail.ru

Якименко Владислав Андреевич, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: Yavladislav87@gmail.com

Вадохин Матвей Анатольевич, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: vma20@mail.ru

Угурчиева Дали Ибрагимовна, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);
e-mail: daliyagurchieva@gmail.com

Grigory A. Demyashkin*, Dr. Sci. (Med.), Medical Radiological Research Center named after A.F. Tsyba — Branch of the National Medical Research Center of Radiology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia (Sechenov University);
e-mail: dr.dga@mail.ru

Vladislav A. Yakimenko, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia (Sechenov University);
e-mail: Yavladislav87@gmail.com

Matvey A. Vadyukhin, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia (Sechenov University);
e-mail: vma20@mail.ru

Dali I. Ugurchieva, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia (Sechenov University);
e-mail: daliyagurchieva@gmail.com

Корякин Сергей Николаевич, к.б.н., Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;
e-mail: korsernic@mail.ru

Sergey N. Koryakin, Cand. Sci. (Biol.), Medical Radiological Research Center named after A.F. Tsyba — Branch of the National Medical Research Center of Radiology;
e-mail: korsernic@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭТИЛКАРБАМАТА НА CD21⁺-КЛЕТКИ СЕЛЕЗЁНКИ

Е.С. Самакина

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»
428015, Российская Федерация, Чувашская Республика, Чебоксары, Московский пр-кт, 15

Селезёнка — один из органов иммунной системы, участвующий в В-клеточном иммунном ответе, в котором локализуются наивные и зрелые В-лимфоциты в определённых зонах. При уменьшении В-клеток в кровотоке селезёнка восполняет их количество. В данном органе происходит образование антител, которые являются важным звеном в гуморальном иммунном ответе. В ходе эксперимента выявлено, что однократное введение этилкарбамата вызывает изменения и в лёгких, и в селезёнке. При анализе гистологических срезов через 6 мес. после поступления этилкарбамата в селезёнке имеются признаки инволюции белой пульпы, уменьшается количество CD21⁺-клеток, что свидетельствует об угнетении В-клеточного иммунного ответа и, вероятно, о снижении гуморального иммунного ответа.

Ключевые слова: этилкарбамат, селезёнка, количество CD21⁺-клеток

Конфликт интересов: автор заявил об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Самакина Е.С. Оценка влияния этилкарбамата на CD21⁺-клетки селезёнки. *Биомедицина*. 2024;20(4):78–86. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-78-86>

Поступила 27.12.2023

Принята после доработки 08.04.2024

Опубликована 10.12.2024

EVALUATION OF THE EFFECT OF ETHYL CARBAMATE ON CD21⁺-SPLEEN CELLS

Ekaterina S. Samakina

I.N. Ulianov Chuvash State University
428015, Russian Federation, Chuvash Republic, Cheboksary, Moskovsky Ave., 15

The spleen is an organ of the immune system that is involved in the B-cell immune response. In certain areas of the spleen, naive and mature B lymphocytes are localized. Upon a decrease in B cells in the bloodstream, the spleen replenishes their number. In this organ, antibodies are formed, which are an important link in the humoral immune response. The conducted experiment revealed that a single administration of ethyl carbamate causes changes in both the lungs and the spleen. An analysis of histological sections showed that, six months after the receipt of ethyl carbamate, the spleen showed signs of white pulp involution, along with a decrease in the number of CD21⁺ cells. This indicates an inhibition of the B-cell immune response and a probable decrease in the humoral immune response.

Keywords: ethyl carbamate, spleen, number of CD21⁺-cells

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

For citation: Samakina E.S. Evaluation of the Effect of Ethyl Carbamate on CD21⁺-Spleen Cells. *Journal Biomed*. 2024;20(4):78–86. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-4-78-86>

Submitted 27.12.2023
Revised 08.04.2024
Published 10.12.2024

Введение

Рак лёгких является распространённой и очень частой причиной смертности, связанной с онкопатологией во всём мире. Известно, что любое хроническое воспаление приводит к повышенному риску формирования рака в организме человека [21]. Лёгкие уязвимы для различных химических и биологических повреждений. При постоянном воздействии патологических факторов высвобождаются воспалительные цитокины из клеток, что приводит к хроническому воспалению и повышенному риску неопроцессов в лёгких [18, 23]. Цитокины стимулируют онкогенную сигнализацию в раковых клетках, включая ядерный фактор NF-κB, тем самым способствуя выживанию и пролиферации опухоли. Хроническое воспаление является характерным фенотипом уретановой опухоли [20, 23].

Этилкарбамат, или уретан — это канцероген, который широко распространён в жизни человека. Он входит в состав продуктов питания, которые прошли ферментативную обработку (например, алкоголь и молочные продукты), используется при обработке одежды, для изготовления стоматологических композитов, в производстве пестицидов, фумигантов, является важным компонентом при изготовлении пенопласта и др. Входит в состав полимерных материалов, которые загрязняют окружающую среду. Кроме этого, имеются данные литературы о том, что уретан вызывает Kras-мутацию, что приводит к образованию злокачественной опухоли лёгкого [19].

Селезёнка содержит кроветворные и лимфоидные элементы, является основным местом экстрамедуллярного кроветворения и удаляет из кровоснабжения повреждённые и состарившиеся эритроциты, а также твёрдые частицы и циркулирующие бакте-

рии. В этом органе начинаются адаптивные иммунные реакции против захваченных из крови возбудителей [12, 14, 16]. В состав селезёнки входят две структуры: красная и белая пульпа. Белая пульпа богата T- и B-лимфоцитами, при скоплении которых образуются соответствующие области: периартериальная лимфоидная муфта, маргинальная и мантийная зоны и герминативный центр [9, 12, 14, 16]. Кроме того, в этом органе обнаруживаются клетки, высокоспециализированные в антигенной презентации (фолликулярные дендритные клетки, макрофаги). Выраженный иммунный ответ на антигены может привести к увеличению количества клеток в областях В-зоны и увеличению числа вторичных фолликулов с выраженными герминативными центрами [12, 14, 16].

В-клетки — одни из компонентов клеточной иммунной системы, которая защищает человека от проникновения патогенов. В ответ на антиген эти клетки дифференцируются в плазматические клетки и производят большое количество антител, которые связываются с патогеном и уничтожают его [4]. Недавние исследования показали, что B-лимфоциты, на поверхности которых находится белок к CD21, обнаруживаются и в селезёнке [13, 15]. В-клетки преимущественно локализованы в маргинальной зоне селезёнки, большая часть которых поступает из общего кровотока, находясь в преактивном состоянии, и обладают большей предрасположенностью к дифференцировке в плазматические клетки [7, 11, 18]. В строме маргинальной зоны В-клетки расположены в тесном контакте с макрофагами, дендритными клетками, гранулоцитами, которые совместно производят захват и элиминацию патогенов из кровеносного русла [7, 18]. Из этого выходит, что В-клетки маргинальной зоны способны

сформировать первую линию иммунной защиты против антигенов [17].

CD21 локализуется на В-клетках и фолликулярных дендритных клетках, где он связывается с продуктами расщепления белка комплемента C3 [4, 8, 10, 11]. CD21 способствует интернализации иммунных комплексов В-клетками для усиления презентации антигена. CD21 в сочетании с CD19/CD81 также служит дополнительным активационным комплексом с рецептором антигена В-клеток, позволяя использовать более низкую концентрацию антигена для достижения максимальной активации В-клеток [10, 22]. Кроме этого, улавливает иммунные комплексы на поверхности фолликулярных дендритных клеток и отображает их активированным В-клеткам в зародышевых центрах. Таким образом, CD21 В-лимфоциты участвуют в непосредственном переходе в плазматические клетки и выработке антител [5, 7, 10]. В связи с этим встал вопрос, как изменится количество CD21⁺-клеток селезёнки в ответ на попадание этилкарбамата в организм.

Цель исследования — оценить реакцию CD21⁺-клеток и морфометрические параметры селезёнки через 3 и 6 мес. после воздействия этилкарбамата.

Материалы и методы

Работа выполнена на 38 крысах-самцах популяции линий Wistar с исходной массой тела 100–150 г, выведенных и содержавшихся в виварии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова». Возраст животных на начало эксперимента составлял 2 мес. Исследование согласовано и одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова». На протяжении всего эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария, в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержа-

нию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», Руководством по содержанию и использованию животных для экспериментов и в научных целях (FELASA, 2007 г.), СанПин 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально биологических клиник (вивариев)», Решением совета Евразийской экономической комиссии № 89 от 03.11.2016 г. «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях (Соответствует требованиям Европейской экономической зоны).

Крысы-самцы были разделены на две группы: контрольная группа (n=8) — без введения этилкарбамата; опытная группа (n=18) — вводился однократно внутривентриально этилкарбамат в дозе 1 г/кг массы тела, предварительно разведённый в 1 мл физ. р-ра по модели Л.М. Шабат (1967 г.).

Животные выводились из эксперимента через 3 и 6 мес. после введения этилкарбамата путём цервикальной декапитации с применением телазола из расчёта 15 мг/кг внутримышечно. Объектом исследования была селезёнка тех крыс (n=18), у которых при макроскопическом исследовании в лёгких обнаруживались узелки белого, бело-серого цвета диаметром до 1–2 мм, выступающие над паренхимой лёгкого. Микроскопическая картина характеризовалась диффузной пролиферацией альвеолярного эпителия под плеврой, утолщением межальвеолярных перегородок. Местами спавшиеся альвеолы, возле брон-

хов среднего и крупного калибров очаговая пролиферация альвеолярного эпителия, местами с апоптотическими тельцами. Бронхиальный эпителий сочетал базально-клеточную гиперплазию и плоскоклеточную метаплазию.

В работе использовались следующие методы исследования:

1. Измерение массы тела и селезёнки крыс-самцов с помощью порционных весов CAS SW-02 («CAS Согр.», Южная Корея) и электронных лабораторных весов серии «Эва» Ска-120В (ООО «СКЕЙЛ-КАС» Россия).

2. Окраска гематоксилином и эозином для оценки общей гистологической структуры и проведение морфометрических параметров с помощью микроскопа Микромед 3 Люм («Микромед», Россия/Китай).

3. Исследование ультратонких срезов селезёнки толщиной 60–80 нм проводилось в HRTEM-режиме на просвечивающем электронном микроскопе Hitachi HT 7700 Exalens («Hitachi», Япония) при ускоряющем напряжении 100 кэВ с разрешением 0,144 нм.

4. Иммуногистохимические исследования с использованием моноклонального антитела к CD21 клон 2G9 («Leico», Великобритания). Исследование выполняли в соответствии со стандартными протоколами. Тканевые срезы толщиной 4 мкм наносили на высокоадгезивные стекла с полилизинным покрытием и высушивали при температуре 37°C в течение 18–20 ч. Окрашивали ручным способом с использованием систем визуализации Leica ChromoPlex™ 1 Dual Detection for BOND («Leica Biosystems», Германия). Для контроля чувствительности и специфичности реакции использовали неиммунизированные сыворотки.

5. Компьютерная морфометрия — измерение площади лимфоидных узелков (ЛУ), герминативного центра (ГЦ), дли-

ны периаартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ), толщины стенки центральной артерии селезёнки, диаметра внутреннего просвета центральной артерии селезёнки выполнялось с помощью лицензионной программы «Микро-Анализ» (Россия). Иммуногистохимическую реакцию оценивали с помощью автоматического выделения окрашенного DAB. Подсчёт площади проводился в процентном соотношении к площади снимка. Измерения проводились не менее чем в 10 полях зрения.

6. Рассчитывали индекс Керногана (ИК) — для определения пропускной способности центральной артерии селезёнки [3]:

$$\text{ИК} = 2 \times \frac{L}{D},$$

где L — толщина стенки центральной артерии, D — внутренний диаметр центральной артерии.

Все полученные данные обрабатывались статистически. Достоверность результатов оценивали по t-критерию Стьюдента. Полученные данные выражали в виде средней арифметической со средней ошибкой, соответственно, $M \pm m$.

Результаты исследований

Масса крысы-самца и селезёнки через 3 мес. после введения этилкарбамата достоверно уменьшается в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,0014$; $p < 0,015$). При микроскопическом исследовании выявляется характерная картина селезёнки. Имеются красная и белая пульпа. В красной пульпе отмечается полнокровие паренхимы. Выявляются сливание ПАЛМ и ЛУ между собой. Соотношение между первичными и вторичными ЛУ составляет 1:2,25 соответственно. Структура ЛУ нарушена. Границы между зонами ЛУ размыты, нечёткие, трудноразличима граница между маргинальной зоной и красной пульпой. В ГЦ встречаются макрофаги. Происходит незначительное снижение площади ЛУ, но при этом увеличивается площадь ГЦ

в 1,4 раза ($p < 0,045$) и его диаметр, в 1,5 раза ($p < 0,0452$) по сравнению с контрольной группой соответствующего возраста (табл.). Изменяется ширина ПАЛМ в сторону увеличения в 1,44 раза ($p < 0,0359$) (табл.). В центральной артерии селезёнки уменьшается просвет диаметра за счёт утолщения её стенки, что приводит к увеличению индекса Керногана, который составляет 4,42 у опытной группы. У контрольной группы данный индекс равен 2,1.

При ультрамикроскопическом исследовании после воздействия этилкарбамата через 3 мес. в лимфоцитах по всей периферии ядра утолщается гетерохроматин, он преобладает над эухроматином, органоиды смещаются к периферии, уменьшается количество митохондрий до 4–5 шт. по сравнению с контрольной группой (количество митохондрий в лимфоцитах контрольной группы — до 6–7 шт.). В плазматических клетках на апикальной части выявляются рибосомы — до 7–8 шт., крупного размера, с плохо развитой эндоплазматической сетью, ядро расположено на базальной части клетки. В макрофагах митохондрии отчёт-

ные, с трудноразличимым матриксом и кристами, кроме этого, возникло увеличение их в количестве, до 10–12 шт. по сравнению с контрольной группой соответствующего возраста. Также отмечаются единичные ретикулоциты и гранулярные клетки.

Реакция CD21⁺-клеток через 3 мес. в ЛУ выше после внутривенного введения этилкарбамата в 1,46 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,007$), преимущественно за счёт увеличения количества клеток в ЛУ с ГЦ (рис. 1). В красной пульпе также происходит увеличение CD21⁺-клеток в 1,19 раза ($p < 0,026$). В ПАЛМ, наоборот, происходит снижение количества в 1,33 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,023$).

Через 6 мес. после воздействия этилкарбамата происходит недостоверное уменьшение массы крыс-самцов в 1,2 раза по сравнению с контрольной группой. Также происходит уменьшение массы селезёнки в 1,3 раза ($p < 0,008$) по сравнению с контрольной группой того же возраста. При микроскопическом исследовании селезёнки нарушена типичная картина орга-

Таблица. Морфометрические показатели селезёнки контрольной и опытной групп крыс
Table. Morphometric parameters of the spleen in the control and experimental groups of rats

Показатели	Контрольная группа		Опытная группа	
	3 мес.	6 мес.	через 3 мес. после введения этилкарбамата	через 6 мес. после введения этилкарбамата
Площадь ЛУ, мкм ²	390 632,1±32 695,91	473 391,9±44 063,86	351 262,89±24 821,67	—
Диаметр ЛУ, мкм	795,569±36,469	799,924±26,0596	718,628±15,995**	—
Площадь ГЦ, мкм ²	32 180,367±986,099	47 489,7±11 358,14	45 136,088±1401,559**	—
Диаметр ГЦ, мкм	264,182±26,075	318,96±24,09	393,123±23,229**	—
Ширина ПАЛМ, мкм	256,529±15,123	354,352±19,693	368,998±14,329**	231,49±19,58*
Толщина стенки центральной артерии, мкм	14,95±0,54	7,59±0,42	17,18±0,397**	10,37±1,094*
Диаметр просвета центральной артерии, мкм	14,25±1,43	8,132±1,25	7,77±0,709*	6,583±0,37*

Примечание: ЛУ — лимфоидные узелки, ПАЛМ — периартериальная лимфоидная муфта, ГЦ — герминативный центр. * — $p < 0,01$; ** — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Note: LNU — lymphoid nodules, PALM — periarterial lymphoid clutch, GC — germinative center. * — $p < 0.01$; ** — $p < 0.05$ compared to the control group.

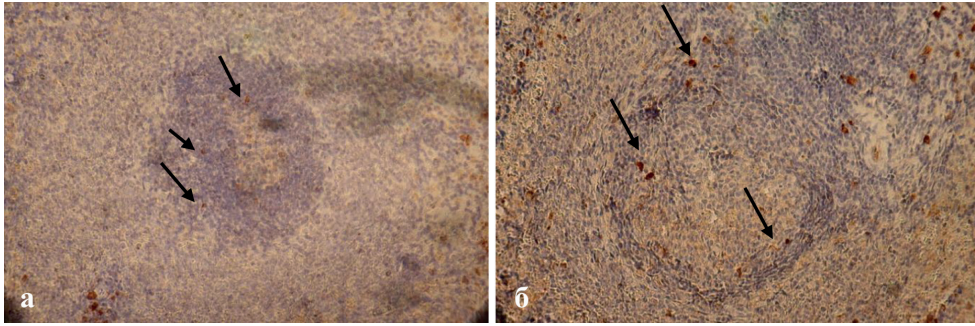


Рис. 1. Селезёнка крысы. Иммуногистохимическая реакция на CD21⁺. Микроскоп «Микромед 3 Люм», ув. ×400.
Примечание: а — селезёнка контрольной группы через 3 мес., единичные CD21⁺-клетки в герминативном центре, мантийной и маргинальной зоне (окрашены коричневым, указаны стрелками). б — селезёнка крысы через 3 мес. после введения этилкарбамата. Увеличение количества CD21⁺-клеток (окрашены коричневым, указаны стрелками).

Fig. 1. Rat spleen. Immunohistochemical reaction to CD21⁺. Microscope Micromed 3 Lum, magn. ×400.
Note: а — spleen of the control group after three months, single CD21⁺ cells in the germinal center, mantle and marginal zone (colored brown, indicated by arrows). б — rat spleen three months after administration of ethyl carbamate. An increase in the number of CD21⁺ cells (colored brown, indicated by arrows).

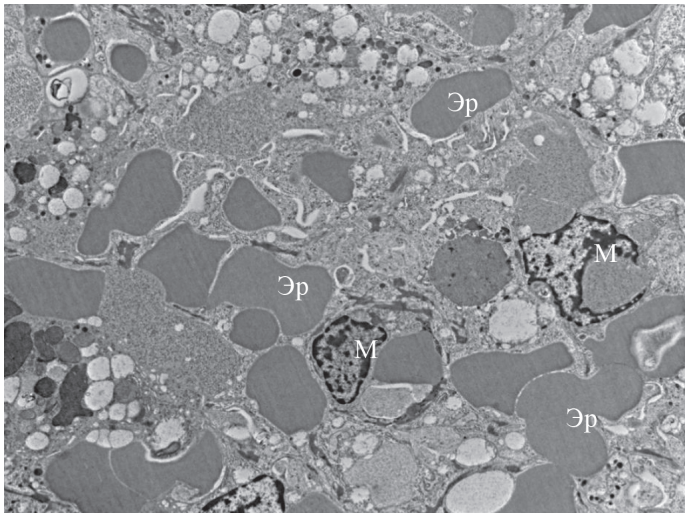


Рис. 2. Электронограмма селезёнки крысы-самца через 6 мес. после введения канцерогена. Увеличение эритроцитов. Единичные макрофаги. Эр — эритроцит, М — макрофаг, ув. ×2000.

Fig. 2. Electronogram of the spleen of a male rat six months after the administration of the carcinogen. An increase in red blood cells. Single macrophages. Эр — erythrocyte, М — macrophage, magn. ×2000.

на. В основном паренхима представлена красной пульпой и ПАЛМ, отсутствуют ЛУ как первичные, так и вторичные. Возникает незначительное снижение ширины ПАЛМ в 1,2 раза ($p < 0,0009$) по сравнению с контрольной группой (табл.). Изменяется

толщина и просвет центральной артерии селезёнки по сравнению с контрольной группой (табл.), что указывает на уменьшение её пропускной способности. У контрольной группы индекс Керногана составлял 1,86, а у опытной группы того же

возраста — 3,15, т. е. наблюдается его увеличение в 1,7 раза.

При электронной микроскопии всю площадь занимают эритроциты, отмечаются единичные макрофаги.

Иммуногистохимическую реакцию на CD21⁺-В-лимфоциты и фолликулярные клетки в ЛУ через 6 мес. после введения этилкарбамага оценить не удалось, т. к. они отсутствовали. В ПАЛМ и в красной пульпе отмечалось снижение CD21⁺-клеток в 1,64 и 1,5 раза соответственно ($p < 0,00002$ и $p < 0,00021$).

Обсуждение результатов и заключение

Этилкарбамат вызывает изменения не только в структуре лёгкого [19], но и в селезёнке. По данным литературы, селезёнка — один из органов, участвующих в противовоспалительном и противоопухолевом иммунном ответе [5]. Указывается, что наиболее чувствительна к воздействиям белая пульпа селезёнки.

Введение этилкарбамага приводит к нарушению структуры селезёнки. Через 3 мес. после его однократного внутрибрюшинного введения происходит уменьшение площади ЛУ, отсутствие отчётливой границы между зонами, увеличение герминативного центра и увеличение ПАЛМ, увеличение CD21⁺-клеток в ЛУ и уменьшение в ПАЛМ. Данные изменения указывают на выраженность гуморального и клеточного звена иммунитета [1], а также на начальные

гипопластические признаки ЛУ. Вероятно, уменьшается пролиферативная активность клеток в ответ на попадание антигена [2]. Кроме того, происходит нарушение в микроциркуляторном русле, что неблагоприятно сказывается на иммунном ответе. На это указывает индекс Керногана, который вычисляется у центральной артерии селезёнки [3]. Изменение данного индекса в сторону увеличения свидетельствует об утолщении стенки и уменьшении просвета в сосуде [1, 19], что ведёт к снижению кровенаполнения [19].

Через 6 мес. после введения канцерогена полностью отсутствуют ЛУ и уменьшаются в размере ПАЛМ, паренхима состоит в основном из красной пульпы селезёнки, что свидетельствует об иволютивном процессе белой пульпы органа. Возникает полное отсутствие данных клеток в ЛУ и уменьшение в остальных компонентах паренхимы. Сокращение и полное отсутствие CD21⁺-клеток может привести к тому, что В-клетки теряют способность генерировать антигенспецифичные плазматические клетки или поддерживать выработку антител в ответ на попадание чужеродного агента, поскольку опосредованная CD21 костимуляция необходима для индукции регуляторов транскрипции Blimp-1 и ХВР-1 — молекул, управляющих дифференцировкой плазматических клеток [17]. Это говорит об угнетении гуморального звена иммунитета при воздействии этилкарбамага.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н. Морфологические характеристики белой пульпы и дендритных клеток селезёнки при экспериментальном канцерогенезе. *Иммунология*. 2019;40(2):7–22. [Arlashkina O.M., Struchko G.Ju., Merkulova L.M., Mihajlova M.N. Morfologicheskie kharakteristiki beloy pul'py i dendritnykh kletok selezenki pri eksperimental'nom kantserogenezе [Morphological characteristics of the white pulp and dendritic cells of the spleen in experimental carcinogenesis]. *Immunology*. 2019;40(2):7–22. (In Russian)]. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-12003
2. Бобрышева И.В. Морфологическая реактивность селезёнки крыс различных возрастных периодов при иммуносупрессии. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2015;6:53. [Bobrysheva I.V. Morfologicheskaya reaktivnost' selezenki krysa razlichnykh vozrastnykh periodov pri immunosupressii [Morphological reactivity of the rat spleen of dif-

- ferent age periods in immunosuppression]. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2015;6:53. (In Russian).
3. Волков В.П. Новый алгоритм морфометрической оценки функциональной иммуноморфологии селезёнки. *Universum: медицина и фармакология*. 2015;5-6(18). [Volkov V.P. Novyuy algoritm morfo-metricheskoy otsenki funktsional'noy immunomorfologii selezenki [New algorithm of the morphometric assessment of functional immunomorphology of the spleen] *Universum: medicina i farmakologiya* [Universum: medicine and pharmacology]. 2015;5-6(18). (In Russian)].
 4. Гривцова Л.Ю., Глухов Е.В., Чулкова С.В., Безнос О.А., Фомина А.В., Неред С.Н., Стилиди И.С., Тупицын Н.Н. Особенности В-клеточного звена иммунитета у больных раком желудка после спленэктомии. *Иммунология*. 2014;35(5):279–286. [Gritsova L.Yu., Glukhov E.V., Chulkova S.V., Beznos O.A., Fomina A.V., Nered S.N., Stilidi I.S., Tupitsyn N.N. Osobennosti B-kletochnogo zvena immuniteta u bol'nykh rakom zheludka posle splenektomii. [Role of splenectomy in peculiarities of peripheral blood B-cell subpopulations in patients with gastric cancer]. *Immunology*. 2014;35(5):279–286. (In Russian)].
 5. Левенец С.В., Садовая А.Ю., Савенок М.А. Морфофункциональные изменения показателей селезёнки при воздействии различных факторов внешней и внутренней среды. *Вестник Луганского государственного педагогического университета. Биология. Медицина. Химия*. 2021;2(66):47–53. [Levenets S.V., Sadovaya A.Yu., Savenok M.A. Morfofunktsional'nye izmeneniya pokazateley selezenki pri vozdeystvii razlichnykh faktorov vneshney i vnutrenney sredy [Morphofunctional changes of spleen indicants under the influence of different external and internal environment factors]. *Vestnik Luganskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta. Biologiya. Meditsina. Khimiya* [Bulletin of Lugansk State Pedagogical University. Biology. Medicine. Chemistry]. 2021;2(66):47–53. (In Russian)].
 6. Лушова А.А., Жеремян Э.А., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Бязрова М.Г., Филатов А.В. Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры. *Иммунология*. 2019;40(6):63–75. [Lushova A.A., Zheremyan E.A., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., Byazrova M.G., Filatov A.V. Subpopulyatsii B-limfotsitov: funktsii i molekulyarnye markery [B-lymphocyte subsets: Functions and molecular markers]. *Immunology*. 2019;40(6):63–75. (In Russian)]. DOI: 10.24411/02064952-2019-16009
 7. Топтыгина А.П. *В-клетки*. М.: МАКС Пресс, 2023:44–45. [Toptygina A.P. *B-kletki* [B-cells]. Moscow: MAKS Press Publ., 2023:44–45. (In Russian)].
 8. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Многоцветный цитометрический анализ. Идентификация субпопуляций В-клеток. *Российский иммунологический журнал*. 2007;1(3–4(10)):220–228. [Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Mnogotsvetnyy tsitometricheskii analiz. Identifikatsiya subpopulyatsiy B-kletok [Multi-color cytometric analysis. Identification of B-cell subpopulations]. *Russian Journal of Immunology*. 2007;1(3–4(10)):220–228. (In Russian)].
 9. Чулкова С.В., Стилиди И.С., Глухов Е.В., Гривцова Л.Ю., Неред С.Н., Тупицын Н.Н. Селезёнка — периферический орган иммунной системы. Влияние спленэктомии на иммунный статус. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2014;25(1–2(94)):21–25. [Chulkova S.V., Stilidi I.S., Glukhov E.V., Gritsova L.Yu., Nered S.N., Tupitsyn N.N. Selezenka — perifericheskii organ immunnoy sistemy. Vliyanie splenektomii na immunnyy status [The spleen as a peripheral immunity organ. Splenectomy effect on the immunity status]. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN* [Bulletin of the Russian National Research Center named after N.N. Blokhin of RAMS]. 2014;25(1–2(94)):21–25. (In Russian)].
 10. Carrillo-Ballesteros F.J., Oregon-Romero E., Franco-Topete R.A., Govea-Camacho L.H., Cruz A., Muñoz-Valle J.F., Bustos-Rodríguez F.J., Pereira-Suárez A.L., Palafox-Sánchez C.A. B-cell activating factor receptor expression is associated with germinal center B-cell maintenance. *Exp. Ther. Med*. 2019;17(3):2053–2060. DOI: 10.3892/etm.2019.7172
 11. Del Nagro C.J. *B cell co-receptors CD19 and CD21 in tolerance and auto-immunity*. University of California, 2005.
 12. Ghosh D., Stumhofer J.S. The spleen: “epicenter” in malaria infection and immunity. *J. Leukoc. Biol*. 2021;110(4):753–769. DOI: 10.1002/JLB.4RI1020-713R
 13. Gjertsson I., McGrath S., Grimstad K., Jonsson C.A., Camponeschi A., Thorarindottir K., Mårtensson I.L. A close-up on the expanding landscape of CD21⁻/low B cells in humans. *Clin. Exp. Immunol*. 2022;210(3):217–229. DOI: 10.1093/cei/uxac103
 14. Golub R., Tan J., Watanabe T., Brendolan A. Origin and immunological functions of spleen stromal cells. *Trends Immunol*. 2018;39(6):503–514. DOI: 10.1016/j.it.2018.02.007
 15. Johnson J.L., Rosenthal R.L., Knox J.J., Myles A., Naradikian M.S., Madej J., Kostiv M., Rosenfeld A.M., Meng W., Christensen S.R., Hensley S.E., Yewdell J., Canaday D.H., Zhu J., McDermott A.B., Dori Y., Itkin M., Wherry E.J., Pardi N., Weissman D., Naji A., Prak E.T.L., Betts M.R., Cancro M.P. The transcription factor T-bet resolves memory B cell subsets with distinct tissue distributions and antibody specificities in mice and humans. *Immunity*. 2020;52(5):842–855. e6. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.03.020
 16. Kashimura M. The human spleen as the center of the blood defense system. *Int. J. Hematol*. 2020;112(2):147–158. DOI: 10.1007/s12185-020-02912-y
 17. Oleinika K., Mauri C., Blair P.A. B cell activation and B cell tolerance. *The Autoimmune Diseases (Sixth Edition)*. 2020:171–187. DOI: 10.1016/B978-0-12-812102-3.00009-9

18. Prokopec K.E., Georgoudaki A.M., Sohn S., Wermeling F., Grönlund H., Lindh E., Carroll M.C., Karlsson M.C. Cutting edge: Marginal zone macrophages regulate antigen transport by B cells to the follicle in the spleen via CD21. *J. Immunol.* 2016;197(6):2063–2068. DOI: 10.4049/jimmunol.1502282
19. Sozio F., Schioppa T., Sozzani S., Del Prete A. Urethane-induced lung carcinogenesis. *Methods Cell Biol.* 2021;163:45–57. DOI: 10.1016/bs.mcb.2020.09.005
20. Stathopoulos G.T., Sherrill T.P., Cheng D.S., Scoggins R.M., Han W., Polosukhin V.V., Connelly L., Yull F.E., Fingleton B., Blackwell T.S. Epithelial NF-kappaB activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007;104(47):18514–18519. DOI: 10.1073/pnas.0705316104
21. Thompson P.A., Khatami M., Baglole C.J., Sun J., Harris S.A., Moon E.Y., Al-Mulla F., Al-Temaimi R., Brown D.G., Colacci A., Mondello C., Raju J., Ryan E.P., Woodrick J., Scovassi A.I., Singh N., Vaccari M., Roy R., Forte S., Memeo L., Salem H.K., Amedei A., Hamid R.A., Lowe L., Guarnieri T., Bisson W.H. Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk. *Carcinogenesis.* 2015;36 Suppl. 1(Suppl. 1):S232–S253. DOI: 10.1093/carcin/bgv038
22. Thorarinsdottir K., Camponeschi A., Gjertsson I., Mårtensson I.L. CD21-low B cells: A snapshot of a unique B cell subset in health and disease. *Scand. J. Immunol.* 2015;82(3):254–261. DOI: 10.1111/sji.12339
23. Xu C., Zhou L., Lu L., Chen T., Wei S., Lin X., Lian X. Inflammation has a role in urethane-induced lung cancer in C57BL/6J mice. *Mol. Med. Rep.* 2016;14(4):3323–3328. DOI: 10.3892/mmr.2016.5661

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ | INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Самакина Екатерина Станиславовна,
ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»;
e-mail: ekaterina1996.96@mail.ru

Ekaterina S. Samakina, I.N. Ulyanov Chuvash State University;
e-mail: ekaterina1996.96@mail.ru

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

1. Порядок направления и опубликования рукописей в рецензируемом издании

1.1. Журнал «Биомедицина» публикует научные работы экспериментального и учебно-методического плана, не публиковавшиеся ранее в других изданиях, а также обзоры по предложению редакционного совета.

Приоритетные области и задачи научных исследований:

- разработка и внедрение новых биомедицинских методов и технологий;
- биологическое, математическое и релевантное моделирование живых систем;
- биотехнология создания генно-модифицированных животных;
- клеточные технологии на основе генно-модифицированных живых объектов и их компонентов для получения лекарственных средств и физиологически активных продуктов;
- стандартизация лабораторных животных в соответствии с рекомендациями GLP, GMP, GCP, EAЭС и российскими нормативами;
- биомедицинские аспекты фармакологии и клинической фармакологии;
- репрезентативность, воспроизводимость и экстраполяции на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах.

1.2. Рубрикация журнала:

1.2.1. Обзор — проблемная статья, содержащая эксклюзивный авторский анализ (требования согласуются с редакцией в индивидуальном порядке).

Представляемые в журнал обзорные статьи должны удовлетворять ряду требований:

– статья должна раскрывать конкретную биомедицинскую проблему и представлять собой авторское исследование, а не переписанные с незначительными изменениями данные из других источников (нейронных сетей, материалов конференций, монографий, других научных трудов);

– статья не должна содержать рассуждений научно-публицистического характера;

– излагаемые в статье факты должны иметь достаточную научную аргументацию;

– несогласие с отдельными научными фактами должно быть обосновано;

– используемые источники не должны быть устаревшими, а терминология должна быть общепринятой и современной.

Представляемые в журнал обзорные статьи, подготовленные на основе результатов сторонних исследований, не отвечающие данным требованиям и не содержащие критического авторского анализа, в соответствии с редакционной политикой не принимаются и не рассматриваются.

1.2.2. Оригинальная статья — труд, отражающий результаты завершённых исследований на актуальную биомедицинскую тематику, имеющий фундаментальное или прикладное значение. Выводы (заключение) работы должны соответствовать поставленным целям и быть аргументированы результатами проведённых исследований (не более 10 стр., до 25 ссылок).

1.2.3. Краткое сообщение — завершённый оригинальный фрагмент работы, представляющий самостоятельный интерес (не более 4 стр., до 15 ссылок).

1.2.4. Практикум — учебно-методическая работа, описывающая используемые в биомедицине оригинальные методики или новые технологии (до 6 стр., до 10 ссылок).

1.3. Актуальные разделы журнала:

• Методы и технологии биомедицинских исследований;

• Релевантное и альтернативное биомоделирование;

• Генетика и эпигенетика животных-биомоделей;

• Биотехнологии в биомедицине;

• Клеточные технологии в биомедицине;

• Доклинические исследования в биомедицине;

- Биомедицинские технологии в клинических исследованиях;
- Биомедицинские технологии в спорте.

1.4. Общие требования к оформлению

1.4.1. Статьи оформляются строго по прилагаемому образцу (<http://scbmt.ru/index.php/biomed>).

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

1.4.3. На первой странице следует указать:

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

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

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

Латинские названия по тексту должны быть выделены курсивом.

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

Учредитель научного журнала «Биомедицина» — ФГБУН НЦБМТ ФМБА России — обеспечивает проверку представляемых к опубликованию рукописей на наличие неправомерных заимствований путём получения от авторов и организаций, направляющих рукопись научной работы в редакцию, информации

в сопроводительных документах о нижеследующем:

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

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

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

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

субклеточный, молекулярный уровень экспериментальных объектов.

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

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

1.4.7. В работах, предметом исследования которых является продукт медицинского назначения (включая, но не ограничиваясь: лекарственный препарат, биологически активная добавка, субстанция и т. д.), необходимо использовать международное непатентованное название (МНН) либо действующее вещество, включая формулу или технологию получения.

1.4.8. Статистическая обработка

В статье должны содержаться только обобщённые и статистически обработанные результаты исследования. В тексте должны быть указаны (в соответствии с Руководством «The ARRIVE guidelines 2.0: Author checklist»):

- параметры сравниваемых групп, включая контроль (если контрольная группа не использовалась, необходимо обоснование);
- критерии включения и исключения в исследование с обоснованием;
- способ рандомизации (с обоснованием, в т. ч. при отсутствии рандомизации);
- кто регулирует распределение групп на разных этапах эксперимента;
- все оцениваемые показатели результатов (например, гибель клеток, молекулярные маркеры или изменения поведения) и исследований по проверке гипотез;

- подробная информация о статистических методах обработки результатов (прикладываются необходимые для расчётов исходные данные), используемое программное обеспечение, информация о соответствии полученных данных предположениям статистического подхода (и что было сделано, если предположения не были выполнены);

- результаты сводной/описательной статистики для каждой экспериментальной группы с мерой изменчивости, где это применимо (например, среднее значение и SD, или медиана и диапазон), либо размер эффекта с доверительным интервалом, если применимо.

1.4.9. Таблицы и иллюстративный материал

Информация, представленная в таблицах, не должна повторяться в тексте статьи. Рисунки не должны дублировать материалы таблиц. Таблицы и рисунки должны быть пронумерованы в порядке их упоминания в тексте и озаглавлены. В тексте в круглых скобках даётся ссылка на них, например: (табл. 1, рис. 1). Все обозначения в таблицах и на рисунках необходимо сопровождать пояснениями в примечании. Для микрофотографий полагается указать способ фиксации образцов и увеличение.

Требования к иллюстрациям:

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

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

1.4.10. Сокращения

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

1.4.11. В конце статьи приводится список цитированной литературы, осуществляется его транслитерация и перевод на английский язык

(раздел «References», согласно требованиям «Scopus»).

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

В списке литературы приводятся:

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

Пример:

1. *Фармакология с основами фармакотерапии*. Рук-во к практ. занятиям (уч. пособ. для студентов медицинских вузов и медицинских факультетов университетов). 6-е изд., испр. и доп. Под ред. П.А. Галенко-Ярошевского, В.Н. Каркищенко. Краснодар: Просвещение-Юг, 2021:1103.

References:

1. *Farmakologiya s osnovami farmakoterapii*. Ruk-vo k prakt. zanyatiyam (uch. posob. dlya studentov medicinskih vuzov i medicinskih fakul'tetov universitetov) [Pharmacology with the basics of pharmacotherapy. Guide to practical classes (a textbook for students of medical schools and medical faculties of universities)]. 6th ed., corr. and enl. Ed. by P.A. Galenko-Yaroshevsky, V.N. Karkischenko. Krasnodar: Prosveshchenie-Yug Publ., 2021:1103. (In Russian).

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

Пример:

2. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В. Современные технологические платформы для геномных и протеомных иссле-

дований. В кн.: *Междисциплинарные исследования в медицине*. М.: Техносфера, 2007:34–67.

References:

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

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

Пример:

3. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Скворцова В.И. Опиоидэргическая система иммунных клеток: новая фармакологическая мишень в терапии «цитокинового шторма». *Биомедицина*. 2020;16(4):14-23.

References:

3. Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Skvortsova V.I. Opioidergicheskaya sistema immunnykh kletok: novaya farmakologicheskaya mishen' v terapii «tstitokinovogo shtorma» [The opioidergic system of immune cells: A new pharmacological target in the therapy of “cytokine storm”]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2020;16(4):14–23. (In Russian). DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-14-23

- для сайта: ссылка на страницу в сети Интернет.

Пример:

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

1.4.12. На последнем листе печатаются сведения об авторах — ФИО (полностью) всех авторов; должность* и место работы каждого (полное название учреждения — как на титульном листе) с указанием* кафедры, отдела, лаборатории; учёная степень и звание (при наличии); адрес электронной почты.

Сведения об авторах переводятся на английский язык.

Отдельно указывается автор (символом * после фамилии), ответственный за переписку, и его мобильный телефон*.

На бумажном экземпляре рядом с фамилиями проставляются собственноручные подписи всех авторов рукописи.

1.5. Корректурa

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

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

1.7. Адрес редакции

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

• Электронные адреса:

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

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

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

1.8. Сроки опубликования работ

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

2. Порядок рецензирования статей, направленных в редакцию рецензируемого издания — научного журнала «Биомедицина»

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

2.2. Рукопись научной статьи, поступившая в редакцию журнала «Биомедицина», рассматривается ответственным секретарём на предмет соответствия профилю журнала, требованиям к оформлению, регистрируется. Ответственный секретарь направляет статью на рецензирование одному или нескольким рецензентам.

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

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

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

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

2.7. Статья, направленная автору на доработку, должна быть возвращена в исправленном виде

* информация для редакции, не публикуется

в течение месяца. К переработанной рукописи необходимо приложить письмо от авторов, содержащее ответы на все замечания и поясняющее все изменения, сделанные в статье.

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

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

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

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

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

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

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

- соответствие материала, изложенного в статье, профилю журнала;
- актуальность содержания статьи: соответствует ли уровень изложенного в ней материала современным достижениям науки и техники;
- значимость полученных результатов исследований (научных, практических);
- качественную и/или количественную оценку приведённого в статье материала (фактического, иллюстрационного);
- полноту и достоверность приводимых сведений;
- правильность и точность используемых (или вводимых) определений и формулировок;
- оценку литературного стиля изложения материала;
- обоснованные выводы о статье в целом, замечания, при необходимости — рекомендации по её улучшению.

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

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

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

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 «Электрогорский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России

Филиал «Электрогорский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (до 2013 года – Питомник «Белый мох» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН) ведёт свою историю с 1974 года и обеспечивает потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируруемыми 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, ведущие производители и испытатели лекарственных средств.

Филиал «Электрогорский» предлагает следующих животных:

- кролики породы «Советская Шиншилла» и «Новозеландская Белая»;
- белые мыши и крысы (линейные и беспородные), хомяки, морские свинки и др. лабораторные животные, по запросу.

Питомник находится в экологически чистом районе Московской области и имеет площадь более 1600 Га, включая пашни и сельхозугодия. В настоящее время общее поголовье составляет около 2000 голов. Животные содержатся клеточным способом, с учётом всех видовых и половозрастных критериев, что подтверждается сертификатами качества и ветеринарными сопроводительными документами. Для кормления поголовья используется только сено собственного производства, корнеплоды, комбикорм с витаминными и минеральными добавками. Ведущими специалистами с многолетним опытом работы успешно применяются необходимые схемы разведения с целью улучшения экстерьера и племенных качеств животных, также ведутся научные работы по созданию кроликов мясного типа с высокой плодовитостью. Регулярно производится контроль темпов роста, эффективности кормления, условий содержания животных. Взаимодействие с профессионалами в области животноводства, посещение значимых выставок, отслеживание тенденций и новостей помогает нам закреплять старые и получать новые знания. Современные технологии, применяемые в питомнике, позволяют получать лабораторных животных, которые будут обладать новыми свойствами (например, не восприимчивыми к гепатиту В), что позволит их использовать в научных исследованиях соответствующей специфики. Филиал оперативно отвечает на запросы научных лабораторий, производя животных с учётом конкретных потребностей и параметров предстоящей экспериментальной работы.

142530, Московская обл., г.о. Павловский Посад,
г. Электрогорск, пр. Мечникова, д. 2
Тел.: 8(496)433-21-32; 8(496)433-19-39
Закупка животных: <https://rabbit.su>
E-mail: Bel.mox@mail.ru

