

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

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

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 17

2021

4



Уважаемые коллеги, дорогие друзья!



Сердечно поздравляем всех с Новым годом и Рождеством!

Традиционно подводя итоги, хотим особо отметить некоторые моменты и достижения. В этом году мы зарегистрировали электронную сетевую версию нашего журнала (ISSN Online 2713–0428) и впервые опубликовали выпуск в цифровом формате. Электронная и печатная версия имеют одинаковый статус, в т. ч. для ВАК при Минобрнауки России, при этом онлайн-формат позволяет вмещать больший объём информации и готовится быстрее, а значит и быстрее поступает к читателю, авторам и в электронную

библиотеку. Мы с радостью сообщаем, что индекс цитируемости наших публикаций стабильно растёт, и к настоящему времени (по результатам анализа за 2020 год) **двухлетний импакт-фактор РИНЦ журнала «Биомедицина» с учётом цитирования из всех источников составил 1,000.**

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 авторам, присылающим свои работы и активно сотрудничающим с редакцией журнала, членам редакционного совета за неоценимую помощь и пожелания по улучшению качества публикуемых статей, сотрудникам издательства «Нэйкон» за своевременную подготовку и типографскую печать наших выпусков, несмотря на нынешнюю сложную, порой критическую эпидемиологическую ситуацию в стране и мире.

Мы верим в то, что вместе справимся со всеми препятствиями и твёрдо сохраняем свои позиции. Публикации статей остаются бесплатными для всех, все авторы будут безвозмездно получать экземпляр журнала со своей статьёй. И хотя с середины этого года Агентство «Роспечать» прекратило свою деятельность по подписным кампаниям, а с нового года не будет приниматься журнальная подписка в отделениях ПАО «Почта России», но подписаться на «Биомедицину» по-прежнему можно — онлайн, каталоги «Пресса России» и «Пресса по подписке» (подписной индекс 57995).

Желаем всем нашим авторам и читателям успехов в научной работе, ценных результатов и новых достойных статей, счастья и, конечно же, самое главное — здоровья вам и вашим близким!

*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

2021, Том 17, № 4

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

JOURNAL BIOMED

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.
Quarterly.

2021, Vol. 17, No. 4

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

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

■ Главный редактор

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

■ Заместители главного редактора

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

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н.

■ Ответственный секретарь

Алимкина Оксана Владимировна

■ Члены редакционного совета

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

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

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

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

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

Воевода Михаил Иванович, д.м.н., проф., акад. РАН (Новосибирск, Россия)

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

Дубина Михаил Владимирович, д.м.н., акад. РАН (Санкт-Петербург, Россия)

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

Зефиоров Андрей Львович, д.м.н., проф., акад. РАН (Казань, Россия)

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

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

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

Макляков Юрий Степанович, д.м.н., проф. (Ростов-на-Дону, Россия)

Максимович Наталия Евгеньевна, д.м.н., проф. (Гродно, Республика Беларусь)

Матишов Геннадий Григорьевич, д.г.н., проф., акад. РАН (Ростов-на-Дону, Россия)

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

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

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

Пинелис Всеволод Григорьевич, д.м.н., проф. (Москва, Россия)

Пчелинцев Сергей Юрьевич, д.м.н., проф. (Любучаны, Московская обл., Россия)

Раменская Галина Владиславовна, д.фарм.н., проф. (Москва, Россия)

Рембовский Владимир Романович, д.м.н., проф. (Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия)

Решетов Игорь Владимирович, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)

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

Сычёв Дмитрий Алексеевич, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

Хритинин Дмитрий Фёдорович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН (Москва, Россия)

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

Цысь Валентина Ивановна, д.с.-х.н., проф., акад. РАЕН (Смоленск, Россия)

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

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

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

История издания журнала:	Журнал издается с 2005 г.
Периодичность:	4 выпуска в год
Префикс DOI:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Свидетельство о регистрации СМИ:	Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати. Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 от 09.06.2005
Индексация:	Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук
Подписной индекс:	57995 в объединенном каталоге «Пресса России»
Стоимость одного выпуска:	400 руб.
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Учредитель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Издатель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Редакция:	143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1 Тел.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Тираж:	3000 экземпляров
Типография:	ООО «БЕАН» 603003, Нижегородская обл., Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1
Дата выхода в свет:	10.12.2021

JOURNAL BIOMED

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

■ Editor-in-Chief

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

■ Deputy Editors-in-Chief

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof.

Igor A. Pomytkin, Cand. Sci. (Chem.)

■ Executive Secretary

Oksana V. Alimkina

■ Members of Editorial Council

Konstantin V. Anokhin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Evgeniy E. Achkasov, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Viktor M. Baranov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Anatoliy T. Bykov, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Sochi, Russia)

Vitan Vlahov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the Bulgarian Academy of Sciences and Arts (Sofia, Bulgaria)

Mikhail I. Voevoda, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Novosibirsk, Russia)

Pavel A. Galenko-Yaroshevskiy, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Krasnodar, Russia)

Mikhail V. Dubina, Dr. Sci. (Med.), A.M. of the RAS (Saint Petersburg, Russia)

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

Andrey L. Zefirov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Kazan, Russia)

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

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

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

Yuriy S. Maklyakov, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Rostov-on-Don, Russia)

Nataliya Ye. Maksimovich, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Grodno, Republic of Belarus)

Gennadiy G. Matishov, Dr. Sci. (Geograph.), Prof., Acad. of the RAS (Rostov-on-Don, Russia)

Anatoliy I. Miroshnikov, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

Arkadiy N. Murashev, Dr. Sci. (Biol.), Prof. (Pushchino, Moscow Region, Russia)

Sergey V. Okovityi, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Saint Petersburg, Russia)

Vsevolod G. Pinelis, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Sergey Yu. Pchelintsev, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Lyubuchany, Moscow Region, Russia)

Galina V. Ramenskaya, Dr. Sci. (Pharm.), Prof. (Moscow, Russia)

Vladimir R. Rembovsky, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Kuzmolovskiy, Leningrad Region, Russia)

Igor V. Reshetov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)

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

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

Dmitriy F. Khritinin, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Moscow, Russia)

Boris D. Tsygankov, Dr. Sci. (Med.), Prof., A.M. of the RAS (Moscow, Russia)

Valentina I. Tsys, Dr. Sci. (Agricuilt.), Prof., Acad. of the Russian Academy of Natural Sciences (Smolensk, Russia)

Evgenia V. Shikh, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Evgeniy B. Shustov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the Russian Academy of Natural Sciences (Saint Petersburg, Russia)

JOURNAL BIOMED

Founded:	The journal has been published since 2005.
Frequency:	Quarterly
DOI Prefix:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Mass media registration certificate:	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 of 09.06.2005
Indexing:	The Journal is included into the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading per-reviewed scientific journals recommended for publishing the basic research results of doctor and candidate theses)
Subscription index:	57995 in the combined catalogue "Pressa Rossii"
Price:	400 RUR
Content distribution terms:	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Founders:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1
Publisher:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Circulation:	3000 copies
Printing house:	BEAN, LLC. 603003, Russian Federation, Nizhny Novgorod Region, Nizhny Novgorod, Barrikad Street, 1
Publication date:	10.12.2021

■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- В.Н. Каркищенко, А.Г. Берзина, Т.А. Климова, Н.Б. Гамалея, Р.А. Агельдинов, А.Е. Кузнецов, И.С. Корсун, М.С. Нестеров, Л.И. Ульянова**
 Формирование, характеристика и *in vivo* тестирование липосомированных антиидиотипических антител к производным морфина 8
- С.Л. Люблинский, И.Н. Люблинская, Е.М. Колоскова, А.М. Азизов, В.Н. Каркищенко, М.С. Нестеров, А.В. Капцов, Р.А. Агельдинов, В.Н. Герасимов, Д.В. Гриненко**
 Технологические аспекты получения субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги. 18
- А.А. Блажко, И.И. Шахматов, В.М. Вдовин, Ю.А. Бондарчук, Н.А. Лычева, С.В. Москаленко, И.Н. Манаева**
 Влияние адаптогенов животного происхождения на микроциркуляторное русло у крыс 38
- Н.Ю. Тимофеева, Н.В. Бубнова, Г.Ю. Стручко, О.Ю. Кострова, И.С. Стоменская**
 Методы экспериментального моделирования метастазирования 44
- ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ
- Е.В. Болотник, Л.И. Алексеева, Л.П. Ларионов**
 Ранозаживляющая активность экстракта *Prunella grandiflora* L. 50
- А.Д. Коняева, Е.Ю. Варакута, А.Е. Лейман**
 Морфофункциональные изменения сосудов микроциркуляторного русла в слизистой оболочке полости рта в ходе заживления раневого дефекта при использовании полимерной мембраны 57
- К.А. Некрасова, А.В. Трофимов, А.В. Жахов, С.В. Родин, Н.П. Горбунов, А.В. Петров, Н.В. Пигарева, Г.В. Александров, М.С. Захаров, А.С. Кирьянова, О.Э. Хуттунен, И.В. Бендт, А.Э. Крылова, А.М. Ищенко**
 Доклинические исследования специфических видов токсичности кандидатного лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека для лечения травматических повреждений головного мозга 68

■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

- Vladislav N. Karkischenko, Asya G. Berzina, Tatiana A. Klimova, Natalia B. Gamaleya, Ruslan A. Ageldinov, Alexander E. Kuznetsov, Irina S. Korsun, Maksim S. Nesterov, Lyudmila I. Ulyanova**
Preparation, Characterization and Preliminary *in vivo* Testing
of Liposomated Antiidiotypic Antibodies Against Morphine Derivatives 8
- Stanislav L. Lyublinskiy, Irina N. Lyublinskaya, Elena M. Koloskova, Arif M. Azizov, Vladislav N. Karkischenko, Maksim S. Nesterov, Alexander V. Kaptsov, Ruslan A. Ageldinov, Vladimir N. Gerasimov, Dmitrii V. Grinenko**
Technological Aspects of Obtaining Liposomes Containing of a Complex
of Biologically Active Substances Isolated from Deer Musk 18
- Alexander A. Blazhko, Igor I. Shakhmatov, Vyacheslav M. Vdovin, Yulia A. Bondarchuk, Natalia A. Lycheva, Svetlana V. Moskalenko, Irina N. Manaeva**
Impact of Adaptogens of Animal Origin on Microcirculation in Rats. 38
- Natalia Yu. Timofeeva, Natalia V. Bubnova, Gleb Yu. Struchko, Olga Yu. Kostrova, Irina S. Stomenskaya**
Methods of Experimental Modeling of Metastasis 44
- ## ■ PRECLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE
- Elizaveta V. Bolotnik, Lyudmila I. Alekseeva, Leonid P. Larionov**
Burn Wound Healing Activity of *Prunella Grandiflora* L. Extract 50
- Anastasiia D. Koniaeva, Elena Yu. Varakuta, Arina E. Leuman**
Morphofunctional Changes in Oral Mucosa Vessels when Healing
a Wound Defect Using a Polymer Membrane 57
- Kseniya A. Nekrasova, Alexandr V. Trofimov, Alexandr V. Zhahov, Sergey V. Rodin, Niklay P. Gorbunov, Alexandr V. Petrov, Nataliya V. Pigareva, Georgiy V. Alexandrov, Mikhail S. Zakharov, Anna S. Kiryanova, Olga E. Khuttunen, Irina V. Bendt, Anna E. Krylova, Alexandr M. Ischenko**
Preclinical Studies into Specific Toxicity of a Candidate Drug Based
on Complement C3 neodeterminant Recombinant Humanized Antibody
for Treating Traumatic Brain Injuries 68



ФОРМИРОВАНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И *IN VIVO* ТЕСТИРОВАНИЕ ЛИПОСОМИРОВАННЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ПРОИЗВОДНЫМ МОРФИНА

В.Н. Каркищенко¹, А.Г. Берзина^{2,*}, Т.А. Климова², Н.Б. Гамалея², Р.А. Агельдинов^{1,3},
А.Е. Кузнецов³, И.С. Корсун³, М.С. Нестеров¹, Л.И. Ульянова²

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

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии
им. В.П. Сербского» Минздрава России
119034, Российская Федерация, Москва, Кропоткинский пер., 23

³ ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева»
125047, Российская Федерация, Москва, Миусская пл., 9

Роль искусственных мембранных структур, содержащих лекарственные вещества, значима и перспективна в наши дни при разработке новых препаратов. Липосомальные препараты активно применяются в медицинской практике. Они демонстрируют повышенные показатели эффективности и относительно низкую токсичность. Цель данной работы состояла в инкапсуляции антиидиотипических антител в липосомальную композицию для улучшения их иммуногенных свойств. После приготовления методом дегидратации/регидратации с использованием ультразвуковой обработки были исследованы размер, дзета-потенциал и эффективность загрузки липосом. Были проведены предварительные исследования *in vivo* для оценки адьювантных свойств липосом, различающихся по своим размерам. Нагруженные липосомы наименьшего диаметра (около 110 нм) показали возможность усиления иммунного ответа аналогично ответу, полученному с применением адьюванта Фрейнда. Эти результаты позволяют сконцентрировать внимание на возможности использования нагруженных антителами липосом в дальнейших исследованиях.

Ключевые слова: искусственные мембранные везикулы, липосомы, антитело, иммуноглобулин, вакцины, адьюванты

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Берзина А.Г., Климова Т.А., Гамалея Н.Б., Агельдинов Р.А., Кузнецов А.Е., Корсун И.С., Нестеров М.С., Ульянова Л.И. Формирование, характеристика и *in vivo* тестирование липосомированных антиидиотипических антител к производным морфина. *Биомедицина*. 2021;17(4):8–17. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-8-17>

Поступила 11.06.2021

Принята после доработки 30.08.2021

Опубликована 10.12.2021

PREPARATION, CHARACTERIZATION, AND PRELIMINARY IN VIVO TESTING OF LIPOSOMATED ANTIIDIOTYPIC ANTIBODIES AGAINST MORPHINE DERIVATIVES

Vladislav N. Karkischenko¹, Asya G. Berzina^{2*}, Tatiana A. Klimova²,
Natalia B. Gamaleya², Ruslan A. Ageldinov^{1,3}, Alexander E. Kuznetsov³, Irina S. Korsun³,
Maksim S. Nesterov¹, Lyudmila I. Ulyanova

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

² V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology
of the Ministry of Health Care of Russia
119034, Russian Federation, Moscow, Kropotkinskiy Lane, 23

³ Mendeleev University of Chemical Technology of Russia
125047, Russian Federation, Moscow, Miussskaya Square, 9

Artificial membrane structures containing medicinal substances are highly promising for the development of new drugs. Liposomal preparations are actively used in medical practice due to their high efficacy and relatively low toxicity. Our aim was to encapsulate anti-idiotypic antibodies into a liposomal composition with the purpose of improving their immunogenic properties. Following the preparation of a liposomal composition by the dehydration/rehydration method using ultrasonic treatment, the size, zeta potential, and loading efficiency of liposomes were investigated. Preliminary *in vivo* studies were conducted to evaluate the adjuvant properties of liposomes of varying size. Loaded liposomes of the smallest diameter (about 110 nm) showed the potential of enhancing the immune response similar to that obtained using Freund's adjuvant. These results justify further research into the properties of liposomes loaded with antibodies.

Keywords: artificial membrane vesicles, liposomes, antibody, immunoglobulin, vaccines, adjuvants

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

For citation: Karkischenko V.N., Berzina A.G., Klimova T.A., Gamaleya N.B., Ageldinov R.A., Kuznetsov A.E., Korsun I.S., Nesterov M.S., Ulyanova L.I. Preparation, Characterization and Preliminary *in vivo* Testing of Liposomated Antiidiotypic Antibodies Against Morphine Derivatives. *Journal Biomed.* 2021;17(4):8–17. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-8-17>

Submitted 11.06.2021

Revised 30.08.2021

Published 10.12.2021

Введение

Использование липосом в роли транспортной системы для доставки лекарственных препаратов (ЛП) является общепризнанным подходом к повышению показателей эффективности лечения. Включение ЛП в состав мембранных везикул способствует повышению терапевтического индекса лекарства и пролонгированию его действия. Препараты на основе липосом (ЛПС) нашли применение, в частности, в сфере лечения онкологических заболеваний [9]. Инкапсуляция ЛП в липидные носители

позволяет увеличить их биодоступность, снизить токсичность и риск развития побочных эффектов, а также более эффективно облегчить боль при сочетании онкопрепаратов с местными анестетиками.

При разработке новых ЛПС большое внимание уделяется физико-химическим характеристикам липосом [6, 10]. Липосомы, используемые для инкапсуляции ЛП, должны иметь одинаковый размер (порядка 100–150 нм в диаметре), обладать низким индексом полидисперсности, иметь значения дзета-потенциала <10–15 мВ. Эти параме-

тры обеспечивают наиболее эффективную экстравазацию липосом и удержание их в тканях.

Возможность использования липосом в качестве адъювантов в вакцинных препаратах для людей исследуется достаточно давно [8]. Введение водорастворимых антигенов, таких как белки, в липосомы защищает их от быстрого разрушающего воздействия протеаз. Благодаря этому увеличивается время полужизни антигенов в крови и обеспечивается более длительное взаимодействие антиген-представляющих клеток с иммуногеном после вакцинации. Липосомы используются также в новых РНК-вакцинах для защиты нуклеиновой кислоты от воздействия РНК-аз в организме с целью доставки РНК в клетки [3]. Адъюванты на основе липосом обычно содержат холестерин, лецитин, димиристоил фосфатидилхолин. Преимуществом таких адъювантов является биосовместимость и возможность биodeградации в организме. Кинетика распада микросфер зависит от их химического состава, она может меняться в зависимости от поставленных задач.

Механизм взаимодействия липосом с иммунной системой человека достаточно подробно изучен и описан [11]. После процессинга и презентации антигена происходит поляризация Т-лимфоцитов CD⁴⁺, что в дальнейшем приводит к появлению В-клеток, активации CD⁸⁺ Т-лимфоцитов и гуморального иммунного ответа. Конструкция липосом, заряд и состав бислоя, размер частиц — важные параметры, влияющие на их адъювантные свойства. Адъювантные свойства липосом зависят от способа включения в них антигена, которое может быть достигнуто путем ковалентной липидной конъюгации, нековалентным поверхностным связыванием, а также при электростатическом взаимодействии с липидами противоположного заряда или поверхностной адсорбцией. Было установлено, что при малых разме-

рах антигена лучшие иммунные ответы можно получить методом поверхностной адсорбции антигена на липосомах. Кроме того, включение иммуностимулирующих веществ в липосомальные композиции вакцин также способствует усилению иммунного ответа [1].

Разработка экспериментальных подходов к иммунопрофилактике ряда заболеваний имеет важное практическое значение. Одним из актуальных направлений для исследователей является изучение возможности применения иммунотерапии в лечении наркомании. Действие предлагаемых вакцин основано на блокировании наркотика до того, как он попадет в центральную нервную систему.

При создании вакцины от опиоидной зависимости нами впервые было предложено использование антиидиотипических антител (At2) к двум производным морфина в качестве иммуногена [2]. Ранее в экспериментах на животных вакцинный препарат использовался в сочетании с адъювантом Фрейнда, значительно усиливающим иммунный ответ, но имеющим существенный недостаток — появление гранулем на месте инъекции. Исходя из литературных данных, использование липосом в вакцинных композициях не дает таких нежелательных побочных реакций [7, 11]. Это обстоятельство, а также необходимость поиска адъюванта, не влияющего на конформацию вариабельной части антиидиотипических антител (иммуногена), привело нас к изучению возможности использования липосом в качестве безопасного и эффективного средства для усиления иммунного ответа у экспериментальных животных.

Целью настоящей работы является оптимизация условий включения целевого антигена — антиидиотипических антител (At2) к морфину в искусственные мембранные везикулы — липосомы в качестве перспективной системы доставки, а также

изучение физико-химических характеристик, получаемых липосом (размер, дзета-потенциал, степень включения), и исследование оказываемого эффекта на усиление и специфичность иммунного ответа *in vivo* на модельном животном организме.

Материалы и методы

Материалы

В данной работе использовались следующие реактивы и материалы («Sigma-Aldrich», США): соевый лецитин, сфингомиелин из куриного яичного желтка, холестерол, хлорид натрия, хлорид калия, гидрофосфат натрия, дигидроортофосфат калия, соляная кислота, гидроксид натрия, а также диэтиловый эфир («Panreac Quimica S. L. U.», США), хлороформ («Panreac Quimica S. L. U.», США). Все растворители и реагенты были аналитической степени чистоты, растворы для подготовки проб готовили с использованием деионизованной воды, полученной на установке для получения глубокообессоленной воды (модель «АКВАЛАБ» УВОИ-МФ-1812, «Медиана-Фильтр», Россия). Для проведения и контроля всего эксперимента применяли оборудование, представленное в табл. 1.

Для включения в липосомы использовали антиген — Ат2 кролика, полученные

на основе первичных моноклональных антител мыши к двум производным морфина — карбоксиметильному (КММ) и гемисукцинильному (ГСМ) эфирам. Ат2 были представлены иммуноглобулинами класса G, полученными ранее из антиидиотипической сыворотки кролика с титром Ат2 1×10^{-5} , истощенной от антимишанных антител с помощью аффинной хроматографии [5].

Методы исследования

Для приготовления искусственных мембранных везикул за основу была взята методика приготовления липосом, содержащих антиген в виде белка, способом дегидратации/регидратации [4]. Данная методика была адаптирована в соответствии с имеющимся оборудованием. Условия формирования фосфолипидной мембраны, получения гомогенной водно-масляной эмульсии с включившейся целевой субстанцией и методом очистки от не включившегося белка описаны в табл. 2. Концентрацию белка определяли в соответствии с методикой, прилагаемой к флуориметру Qubit. Распределение размеров липосом контролировалось с помощью динамического рассеяния света, для чего пробу разбавляли в водной среде 1:15 по объему. Результаты были зафиксированы под углом 90° при 23–24°C на лазере

Таблица 1. Оборудование, используемое в эксперименте

Table 1. Equipment used in the experiment

Название	Модель	Производитель
Лабораторные аналитические весы	PA-214C	ОНАУС (США)
Ультразвуковой стержневой гомогенизатор	LABSONIC M	Sartorius AG (Германия)
Ультразвуковая ванна Elmasonic S	40H	Elma Schmidbauer GmbH (Германия)
Холодильники с нижней морозильной камерой	XM-6025–031	Атлант (Белоруссия)
Портативный pH-метр	FG2	Mettler Toledo (США)
Анализатор размеров частиц и дзета-потенциала Photocor	Compact-Z	Фотокор (Россия)
Вортекс персональный	V-1 plus	BioSan (Латвия)
Микроцентрифуга	5430R	Eppendorf (Германия)
Ротационный вакуумный концентратор	RVC 2–25 CDplus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Германия)
Флуориметр	Qubit 3.0	Thermo Fisher Scientific (США)

с длиной волны 658 нм. Полученные данные были обработаны с применением программного обеспечения DynaLS. Измерение дзета-потенциала проводилось методом электрофоретического рассеяния света (анализ доплеровского сигнала) при электрическом поле 10 V/cm и с применением уравнения Смолуховского.

Сбор данных для оценки размеров и дзета-потенциала полученных липосом производили в течение 1-й мин и 30 с соответственно. Анализ полученных результатов с использованием ПО DynaLC проводили по следующим параметрам: диапазон каналов обработки: 40–160, число точек решения 200, многопроходной алгоритм обработки, автоматический поиск границ решения.

Иммуногенность полученных липосомальных препаратов At2 изучали на крысах-самках популяции линий Wistar в воз-

расте около 4-х мес. начальной средней массой 300 г. Схема эксперимента представлена в табл. 3. В каждой группе было по 8 животных. Условия работы с экспериментальными животными соответствовали Приказу Минздрава России № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и директиве ЕС от 22.09.2010 «По охране животных, используемых в научных целях».

Группа 1 была иммунизирована антигеном At2 без адьюванта; группа 5 — с адьювантом; группы 2, 3 и 4 — липосомальными препаратами At2 с размером частиц 110, 240 и 385 нм соответственно. Заборы крови у экспериментальных животных осуществляли прижизненно из бедренной вены. Общий гуморальный иммунный ответ у крыс (антитела к At2) определяли при анализе сывороток крови с помощью непрямого метода ИФА, исполь-

Таблица 2. Условия получения липосом
Table 2. Conditions for obtaining liposomes

Название стадии	Условия	Примечания
Формирование пленки	Пробы упаривались на скорости 1500 об./мин при 35°C в течение 1 ч	Использовали 15 мл пластиковые пробирки
↓		
Ультразвуковая обработка (УЗ стержень)	Диспергирование в течение 15 мин на льду	Рабочая частота — 30 кГц Амплитуда УЗ излучения 100 %
Ультразвуковая обработка (УЗ баня)	Диспергирование в течение 15 мин на льду	Рабочая частота — 37 кГц
↓		
Оценка степени включения	Центрифугирование при 15000 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре	Измеряли не включившийся белок в очищенном супернатанте

Таблица 3. Схема эксперимента по изучению иммунного ответа у крыс к препаратам At2 с различными адьювантами

Table 3. Scheme of an experiment to study the immune response in rats to Ab2 preparations with various adjuvants

№ группы	Вводимый антиген, (доза, мкг/кг)	Адьюванты	Способ введения препаратов	Забор крови
1	At2, 300 мкг/кг	без адьюванта	I инъекция: п/к в 2 точки вдоль хребта через 14 дней II инъекция: п/к в 2 точки вдоль хребта через 14 дней III инъекция: п/к в 2 точки вдоль хребта	35-й день от начала иммунизации
2		липосомы, размер частиц 110 нм, сфингомиелин с холестеринном		
3		липосомы, размер частиц 240 нм, сфингомиелин с холестеринном		
4		липосомы, размер частиц 385 нм, сфингомиелин с холестеринном		
5		с адьювантом Фрейнда		

зую для адсорбции на твердой фазе исходный антиген — At2 к двум производным морфина (КММ и ГСМ), представлявший собой IgG кролика в концентрации 5 мкг/мл. Иммунологическую специфичность образовавшихся третичных (At3) антител в сыворотках иммунизированных крыс определяли в ИФА с использованием в качестве антигена на твердой фазе фенилазопроизводного морфина по 2-му атому углерода, конъюгированного с лизоцимом (ФАМ-лиз.) [5].

Результаты и их обсуждение

В результате работы были получены следующие данные, представленные на рис. 1 и 2, в табл. 4.

Приведенные значения демонстрируют узкое распределение по размерам, что свидетельствует о незначительной вариабельности размеров полученных частиц. Сравнение характеристик демонстрирует, что после обработки УЗ стержнем образуются везикулы с наименьшим размером, большим отклонением и процентным выходом по сравнению с обработкой УЗ баней. Концентрация белка в пробах после финальной стадии показывает 50% включение целевого антитела в состав везикул в обоих образцах с отклонением 1%. Анализ двух возможных методов получения липосом свидетельствует о перспективах применения УЗ стержня для формирования везикул. Однако данный

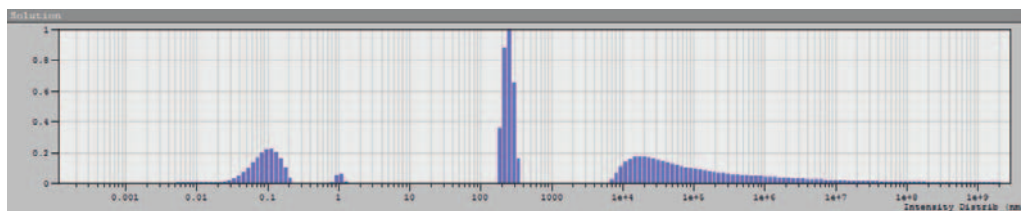


Рис. 1. Графическое представление результата анализа липосом, содержащих антитело, приготовленных с использованием УЗ бани. По оси ординат — амплитуда распределения, по оси абсцисс — гидродинамический радиус частиц (нм).

Fig. 1. Graphical representation of the analysis of antibody-containing liposomes prepared using an ultrasound bath. The ordinate is the distribution amplitude, the abscissa is the hydrodynamic radius of the particles (nm).

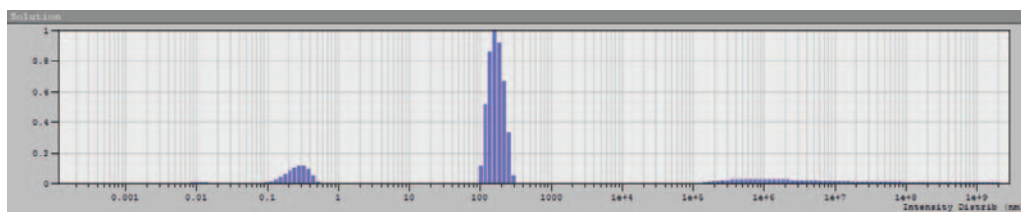


Рис. 2. Графическое представление результата анализа липосом, содержащих антитело, приготовленных с использованием УЗ стержня. По оси ординат — амплитуда распределения, по оси абсцисс — гидродинамический радиус частиц (нм).

Fig. 2. A graphical representation of an analysis of liposomes containing an antibody prepared using an ultrasound rod. The ordinate is the distribution amplitude, the abscissa is the hydrodynamic radius of the particles (nm).

Таблица 4. Размерное распределение используемых липосом
Table 4. Size distribution of liposomes used

Показатель	Баня	Стержень
Среднее значение размера целевых липосом, нм	238,1	166,4
Размер, соответствующий максимальной амплитуде пика липосом, нм	250,5	159,1
Стандартное отклонение, нм	34,35	48,22
Нормированный вклад данного размера частиц, %	34,4	77,4

метод имеет следующие недостатки: возможность перехода частиц металла со стержня в целевой раствор, метод становится более затратным по времени и физически при переходе на большое количество проб, возможность контаминации при формировании (плохо очищенный стержень, открытый сосуд с раствором).

Исследование адъювантных свойств полученных липосом показало, что иммунизация крыс липосомальными препаратами антител Ат2 приводит к индукции Ат1-подобного Ат3 иммунного ответа. Полученные Ат3 положительно реагировали с производным морфина — ФАМ-лиз. В группе 3 титр Ат3 антител был 1×10^{-3} , в группах 2 и 5 титры Ат3 антител совпадали и были равны 2×10^{-3} , а в группах 1 и 4 Ат3 обнаруживались в низких титрах — 1×10^{-2} . У крыс, иммунизированных препаратом Ат2 без адъюванта, Ат3 антитела не обнаруживались.

Оценка общего гуморального иммунного ответа на вводимый антиген в группах крыс показала, что усиление иммунного ответа на 35-й день от начала иммунизации происходит у животных только благодаря применяемым адъювантам (табл. 5). Без адъюванта иммунный ответ был слабым, т.е. антитела к Fc-фрагменту IgG, формирующиеся при введении Ат2 кролика, обнаруживались в титре 1×10^{-2} . По-видимому, это

объясняется тем, что IgG кролика не является для крыс сильным иммуногеном ввиду серологического родства иммуноглобулинов этих двух видов животных. На усиление иммунного ответа существенным образом влиял размер липосом. Как было показано ранее [11], размер липосом важен с точки зрения их применения. В некоторых случаях нужны крупные липосомы, когда инкапсулируются частицы, включающие микроорганизмы, такие как бактерии. Однако во многих случаях предпочтительны мелкие липосомы. Это связано с тем, что мелкие липосомы не так быстро удаляются из ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС), как крупные липосомы (с размерами свыше 200 нм). Кроме того, крупные липосомы при их внутримышечной инъекции не способны достичь регионарных лимфатических узлов и доставить к ним вакцины. Так, в наших экспериментах крупные липосомы с размером 385 нм практически не влияли на усиление иммунного ответа. Наилучшие адъювантные свойства продемонстрировали липосомы с размером частиц 110 нм. Титры антител в сыворотках крови экспериментальных крыс были на уровне тех, что и в группе крыс, иммунизированных тем же антигеном, но с применением адъюванта Фрейнда — $3,2 \times 10^{-4}$. Надо также отметить, что использование всех липосом, независимо от их размера,

Таблица 5. Результаты тестирования сывороток крови экспериментальных крыс при проверке адъювантных свойств липосомальных препаратов Am2

Table 5. The results of testing blood sera of experimental rats when checking the adjuvant properties of liposomal preparations of Ab2

№ группы	OD ₄₉₂ (о. е.) *	Вводимый антиген	Титр антител к Ат2
1	0,25	Ат2 кролика без адъюванта	1×10^{-2}
2	1,68	Ат2 кролика в липосомах 110 нм	$3,2 \times 10^{-4}$
3	0,94	Ат2 кролика в липосомах 240 нм	8×10^{-3}
4	0,73	Ат2 кролика в липосомах 385 нм	4×10^{-3}
5	2,06	Ат2 кролика с адъювантом Фрейнда	$3,2 \times 10^{-4}$

Примечание: * — в таблице представлены средние значения OD₄₉₂ для каждой группы, соответствующие разведению сывороток крови крыс 1:1000. В качестве контроля использована сыворотка крыс до иммунизации. OD₄₉₂ в контроле была 0,07 о. е.

Note: * — the table shows the average OD₄₉₂ values for each group corresponding to a dilution of rat blood serum 1:1000. Serum of rats before immunization was used as a control. OD₄₉₂ in the control was 0.07 ou.

не давало побочных эффектов — гранулем на месте инъекции. В случае применения адьюванта Фрейнда в местах подкожных инъекций у крыс наблюдались гранулемы.

Выводы

1. Сравнение двух методов формирования липосом с помощью УЗ стержня и УЗ бани показало, что каждый метод имеет свои достоинства и недостатки. УЗ баня демонстрирует стабильность по показателям размерности и заряда, при этом процентное содержание сформированных липосом относительно низкое, а среднее значение величины липосом находится на верхней границе допустимого для нашего эксперимента. УЗ стержень характеризуется хорошими показателями размерности и процентного содержания везикул, но отличается низким показателем стабильности и нейтральным зарядом.

2. Показано, что формирование липосом методом дегидратации/регидратации с использованием ультразвуковой (УЗ) обра-

ботки позволяет создать липосомы малого размера (до 385 нм) с отрицательным значением дзета-потенциала.

3. Впервые показано, что введение антиидиотипических (At2) антител к производным морфина в липосомы малого размера (110 нм) способствует усилению иммунного ответа у грызунов.

4. Установлено, что с увеличением диаметра липосом от 110 до 240 нм титр специфических третичных (At3) антител в результате иммунизации уменьшается в два раза. Более крупные липосомы диаметром 385 нм не обладают адьювантным действием. Мелкие липосомы размером 110 нм проявляют адьювантные свойства, аналогичные действию адьюванта Фрейнда.

5. Использование липосомированных антиидиотипических антител к двум производным морфина при вакцинации крыс не дает побочных эффектов в виде гранулем на месте введения, что является выгодным отличием от вакцин с применением адьюванта Фрейнда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Аверина Е.С., Бодоев Н.В., Жамсаранова С.Д., Ламажанова Г.П., Раданаева Л.Д. Иммуномоделирующая активность липосомальных средств, полученных из концентратов жира байкальской нерпы. *Вестник новых медицинских технологий*. 2003;X(3):84–86. [Averina E.S., Bodoev N.V., Zhamsaranova S.D., Lamadzhanova G.P., Radanayeva L.D. Immunomodulatory activity of liposomal funds derived from fat concentrates of the Baikal Nerze]. *Vestnik novykh medicinskih tekhnologij [Bulletin of new medical technology]*. 2003;X(3):84–86. (In Russian)].
2. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Шестаков К.А., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Фокин Ю.В. *Иммуноген для лечения и профилактики зависимости от опиатов*. Патент РФ № 2548802, 2015. [Gamaleya N.B., Berzina A.G., Shestakov K.A., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Fokin Yu.V. Immunogen dlya lecheniya i profilaktiki zavisimosti ot opiatov [Immunogen for the treatment and prevention of opiate dependence]. Patent RF No. 2548802, 2015. (In Russian)].
3. Горяев А.А., Савкина М.В., Обухов Ю.И., Меркулов В.А., Олефир Ю.В. ДНК- и РНК- вакцины: современное состояние, требования к качеству и особенности проведения доклинических исследований. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(2):72–80. [Goryaev A.A., Savkina M.V., Obukhov Yu.I., Merkulov V.A., Olefir Yu.V. DNK- i RNK- vakciny: sovremennoe sostoyanie, trebovaniya k kachestvu i osobennosti provedeniya doklinicheskikh issledovaniy [DNA and RNA Vaccines: Current Status, Quality Requirements and Specific Aspects of Preclinical Studies]. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie [BIO-preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2019;19(2):72–80. (In Russian)].
4. Кэтти Д., Райкундалия Ч., Браун Дж., Линг Н.Р. *Антитела. Методы*. Кн. 1: Пер. с англ. М.: Мир, 1991:287. [Kathy D., Raikundalia Ch., Brown J., Ling N.R. *Antitela, metody [Antibodies. A practical approach]*. Vol. 1. Transl. from English. Moscow: Mir Publ., 1991:287]. (In Russian)].
5. Трофимов А.В., Атанесян В.А., Ищенко А.М., Карабанова Е.А., Рак А.Я., Симбирцев А.С., Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д., Ульянова Л.И., Климова Т.А. Получение поликлональных и моноклональных антиидиотипических антител к морфин-специфическим иммуноглобулинам. *Медицинская им-*

- мунология. 2020;22(1):187–196. [Trofimov A.V., Atanesyan V.A., Ischenko A.M., Karabanova E.A., Rak A.Ya., Simbirtsev A.S., Gamaleya N.B., Berzina A.G., Stankova N.V., Kapanadze G.D., Ulyanova L.I., Klimova T.A. Poluchenie poliklonal'nykh i monoklonal'nykh antiidiotipicheskikh antitel k morfin-spetsificheskim immunoglobulinam [Preparation of polyclonal and monoclonal anti-idiotypic antibodies against morphine-specific immunoglobulins]. *Meditsinskaya immunologiya [Medical Immunology]*. 2020;22(1):187–196. (In Russian)].
6. Briuglia M.-L., Rotella C., McFarlane A., Lamprou D.A. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*. 2015;5(3):231–242.
 7. Janine K.T., Tyler J.A., Saikat M., Brittany A.M., Rachel C.S., Esser-Kahn A.P. Applications of immunomodulatory immune synergies to adjuvant discovery and vaccine development. *Trends in Biotechnology*. 2018;10(004):1–16.
 8. Laouini A., Jaafar-Maalej C., Limayem-Blouza I., Sfar S., Charcosset C., Fessi H. Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the art. *J. of Colloid Science and Biotechnology*. 2012;1(2):147–168.
 9. Olusanya T.O.B., Haj A.R.R., Ibegbu D.M., Smith J.R., Elkordy A.A. liposomal drug delivery systems and anticancer drugs. *Molecules*. 2018;23(4):907. DOI: 10.3390/molecules23040907.
 10. Pathak S.K., Mishra R., Kumar S., Prakash G., Parthasarthy R. Effect of cholesterol concentration on size of liposome. *J. of Pharmacy and Biological Sciences*. 2012;1(1):50–53.
 11. Zahednezhad F., Saadat M., Valizadeh H., Zakeri-Milani P., Baradaran B. Liposome and immune system interplay: Challenges and potentials. *J. of Controlled Release*. 2019;305:194–209.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

Берзина Ася Григорьевна*, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский научно-исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России;
e-mail: berzina07@mail.ru

Климова Татьяна Андреевна, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский научно-исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России

Гамалея Наталия Борисовна, д.м.н., проф. ФГБУ «Национальный медицинский научно-исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России;
e-mail: natgam@mail.ru

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»; ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Кузнецов Александр Евгеньевич, к.т.н., ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»;
e-mail: akuz@muctr.ru

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

Asya G. Berzina*, Cand. Sci. (Biol.), V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: berzina07@mail.ru

Tatiana A. Klimova, Cand. Sci. (Biol.), V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health Care of Russia

Natalia B. Gamaleya, Dr. Sci. (Med.), Prof., V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: natgam@mail.ru

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia; Mendeleev University of Chemical Technology of Russia;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Alexander E. Kuznetsov, Cand. Sci. (Tech.), Mendeleev University of Chemical Technology of Russia;
e-mail: akuz@muctr.ru

Корсун Ирина Сергеевна, ФГБОУ ВО
«Российский химико-технологический универ-
ситет имени Д.И. Менделеева»;
e-mail: irinakorsyn@list.ru

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

Ульянова Людмила Ивановна, д.б.н., ФГБУ
«Национальный медицинский научно-исследо-
вательский центр психиатрии и наркологии име-
ни В.П. Сербского» Минздрава России;
e-mail: oulyanova.46@mail.ru

Irina S. Korsun, Mendeleev University
of Chemical Technology of Russia;
e-mail: irinakorsyn@list.ru

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

Lyudmila I. Ulyanova, Dr. Sci. (Biol.), V. Serbsky
National Medical Research Centre for Psychiatry
and Narcology of the Ministry of Health Care of
Russia;
e-mail: oulyanova.46@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ СУБСТАНЦИИ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ В ЛИПИДАХ УСТОЙЧИВЫХ НАНОЧАСТИЦ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКС БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МУСКУСА КАБАРГИ

С.Л. Люблинский¹, И.Н. Люблинская^{2*}, Е.М. Колоскова², А.М. Азизов²,
В.Н. Каркищенко¹, М.С. Нестеров¹, А.В. Капцов¹, Р.А. Агельдинов^{1,4}, В.Н. Герасимов³,
Д.В. Гриненко³

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

² ООО «Научно-производственная фирма «МОБИТЕК-М»»
249010, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт, 6

³ ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
142279, Российская Федерация, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

⁴ ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева»
125047, Российская Федерация, Москва, Миусская пл., 9

С целью сохранения и повышения биологической эффективности комплекса биологически активных веществ (БАВ), выделенных из мускуса кабарги, изучены технологические аспекты получения субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс БАВ, и выполнена оценка ее стабильности. Установлено, что оптимальным способом получения является гомогенизация под высоким давлением. Разработаны режимы приготовления липосомальной формы БАВ с заранее заданными параметрами дисперсности — средним диаметром частиц 250 ± 100 нм, индексом полидисперсности $0,3 \pm 0,1$ и дзета-потенциалом от -5 до -35 мВ. Установлено, что гомогенизатор высокого давления «Донор-5» позволяет получать липосомальные дисперсии со стандартными параметрами и степенью включения БАВ мускуса до 60%, а также обеспечивает минимальное окисление и гидролиз фосфолипидов (индекс окисленности 0,3). Исследования показали, что использование отечественного фосфатидилхолина является экономически оправданным и позволяет получать липосомальные формы надлежащего качества. Показатели качества полученной липосомальной субстанции охарактеризованы соответствующими методами анализа (динамическое светорассеяние, электронная микроскопия, гель-размерная хроматография, хромато-масс-спектрометрия и др.). На основании полученных результатов разработан проект спецификации на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги. Разработанную технологию получения липосомальной формы БАВ из мускуса кабарги можно масштабировать в соответствии с требованиями GMP.

Ключевые слова: кабарга, мускус, липосомы, гомогенизатор высокого давления

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Люблинский С.Л., Люблинская И.Н., Колоскова Е.М., Азизов А.М., Каркищенко В.Н., Нестеров М.С., Капцов А.В., Агельдинов Р.А., Герасимов В.Н., Гриненко Д.В. Технологические аспекты получения субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги. *Биомедицина*. 2021;17(4):18–37. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-18-37>

Поступила 20.08.2021

Принята после доработки 11.11.2021

Опубликована 10.12.2021

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF OBTAINING LIPOSOMES CONTAINING A COMPLEX OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ISOLATED FROM DEER MUSK

Stanislav L. Lyublinskiy¹, Irina N. Lyublinskaya^{2*}, Elena M. Koloskova², Arif M. Azizov², Vladislav N. Karkischenko², Maksim S. Nesterov¹, Alexander V. Kaptsov¹, Ruslan A. Ageldinov^{1,4}, Vladimir N. Gerasimov³, Dmitrii V. Grinenko³

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

² Scientific and Production Company "MOBITEK-M"
249010, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institute Village, 6

³ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District, Obolensk Settlement

⁴ Mendeleev University Chemical Technology of Russia
125047, Russian Federation, Moscow, Miusskaya Square, 9

In order to preserve and increase the biological effectiveness of biologically active substances isolated from deer musk, we studied technological aspects of obtaining a substance of lipid-stabilized stable nanoparticles from deer musk. The stability of the obtained substance was evaluated. It was found that homogenization under high pressure is an optimal approach to obtaining biologically active substances from deer musk. The modes of preparation of a liposomal form of biologically active substances with predetermined dispersion parameters (average particle diameter 250 ± 100 nm, polydispersity index 0.3 ± 0.1 , and zeta potential from -5 to -35 mV) were determined. It was found that the high-pressure homogenizer "Donor-5" makes it possible to obtain liposomal dispersions with standard parameters and the degree of inclusion of musk biologically active substances up to 60%, at the same time as providing minimal oxidation and hydrolysis of phospholipids (oxidation index 0.3). Our studies showed that the use of a domestic phosphatidylcholine is economically justified and allows obtaining liposomal forms of proper quality. The quality indicators of the obtained liposomal substance were characterised by conventional analytical methods (dynamic light scattering, electron microscopy, gel chromatography, chromatography-mass spectrometry, etc.). On the basis of the results obtained, a draft specification was developed for a liposomal substance (powder) containing a complex of biologically active substances isolated from deer musk. The developed technology for obtaining a liposomal form of biologically active substances from deer musk can be scaled up in accordance with GMP requirements.

Keywords: musk deer, musk, liposomes, high pressure homogenizer

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

For citation: Lyublinskiy S.L., Lyublinskaya I.N., Koloskova E.M., Azizov A.M., Karkischenko V.N., Nesterov M.S., Kaptsov A.V., Ageldinov R.A., Gerasimov V.N., Grinenko D.V. Technological Aspects of Obtaining Liposomes Containing of a Complex of Biologically Active Substances Isolated from Deer Musk. *Journal Biomed.* 2021;17(4):18–37. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-18-37>

Submitted 20.08.2021

Revised 11.11.2021

Published 10.12.2021

Введение

Из пяти основных областей применения нанотехнологий в медицине и фармации в последние годы особенно интенсивно развиваются наноконтейнерные техноло-

гии доставки лекарств. Основной целью этих технологий является максимальное использование «фармацевтических факторов» для обеспечения высокого качества приготовляемых лекарственных средств,

что совпадает со стратегической задачей биофармации [11], которая заключается в максимальном повышении эффективности лекарственных средств и снижении до минимума возможного нежелательного их действия на организм.

Наибольшую популярность среди наноконтейнерных технологий завоевали технологии с применением липосом [1, 5, 17]. Благодаря своим физико-химическим свойствам, мембранотропности и биосовместимости липосомы в наибольшей степени соответствуют всем качествам, необходимым для эффективной доставки функциональных молекул к месту их действия. Поэтому из простой модели, имитирующей клеточные мембраны, липосомы превратились в объект активных научных исследований и практического применения.

На сегодняшний день известно более 100 липосомальных препаратов, как коммерчески доступных, так и проходящих различные стадии клинических исследований. Об особом интересе к разработке лекарств в липосомальной форме свидетельствуют данные реферативного сборника «Изобретения стран мира», где опубликовано более тысячи патентных документов, являющиеся результатом изучения этого вопроса.

Создание липосомальных форм имеет большое практическое значение для разработки новых органолекарств в качестве систем эффективной доставки различных биологически активных веществ (БАВ), полученных из природного сырья, в т.ч. из мускуса кабарги [18].

Липосомы, что в переводе с греческого означает «жировое тело», — это искусственно создаваемые липидные везикулы (пузырьки), состоящие из одного или нескольких фосфолипидных бислоев толщиной 4–20 нм, разделённых водной фазой. Впервые они были описаны в 1965 г. британским учёным А. Бэнгхемом и его коллегами.

Для практического применения липосом исключительно важно понимание их взаимодействия с мембраной клетки. Установлено, что липосома может увеличивать проницаемость мембраны, вызывая образование дополнительных каналов, проходящих через неё; может прикрепляться (адсорбироваться) к мембране; может поглощаться клеткой, и в этом случае вещество, принесённое ею, попадает непосредственно внутрь этой клетки; мембраны липосомы и клетки могут сливаться друг с другом; клеточная мембрана и липосома могут обмениваться липидами [15, 16]. Т.о., благодаря применению липосом появился новый способ направленного воздействия на клетку, который называют «мембранной инженерией» [19].

В настоящее время установлены основные критические точки и их параметры для процесса производства липосомальных препаратов (рис. 1), подлежащие тщательному контролю [4]. При разработке данных технологий необходимо учитывать многочисленные случаи, когда эффективные и безопасные липосомальные препараты, полученные в лабораторных условиях, не всегда удавалось воспроизвести в условиях промышленного производства. Это связано со множеством различных факторов: неоднородностью липидных компонентов, экспозицией биохимически важных функциональных групп на наружной поверхности липосом, фиксированной толщиной водного слоя, числом липидных бислоев и так далее, а также во многом зависит от используемого технологического оборудования и масштаба производства.

В настоящее время существует около 20-ти основных способов получения липосом [12, 20]. Для практического применения необходимо, чтобы разрабатываемые технологии позволяли сочетать стандартность состава и стабильность получаемых липосом, минимальное окисление и гидролиз фосфолипидов, сохранность вводимого

СТАДИИ ПРОИЗВОДСТВА ЛИПОСОМ

1. Субстанция липидов	2. Получение липосом	3. Стерилизующая фильтрация	4. Лиофилизация
<ul style="list-style-type: none"> - содержание основного вещества; - степень окисленности; <ul style="list-style-type: none"> - МБЧ; - температура фазового перехода; - тяжёлые металлы; - эндотоксины; - содержание лизоформ; - остаточные растворители 	<ul style="list-style-type: none"> - температура; - давление; - количество циклов; - степень включения АФС; - размер и заряд ЛС; <ul style="list-style-type: none"> - pH; - стабильность субстанций (ФЛ + АФС); - стабильность липосом; - содержание криопротектора 	<ul style="list-style-type: none"> - подбор материала; - скорость и давление; - температура; - объём и концентрация 	<ul style="list-style-type: none"> - параметры замораживания; - параметры сублимации; - тип и количество криопротектора; - выбор первичной упаковки; - содержание остаточной влажности; - условия герметизации и хранения; - стабильность; - условия регидратации

Рис. 1. Основные критические стадии процесса производства липосомальных препаратов и их параметры.

Fig. 1. Main stages in the production of liposomal preparations and their parameters.

лекарственного препарата с высокой производительностью и простотой способа их получения. Существенное значение имеет наличие стандартного промышленного оборудования и получение препарата в асептических условиях в закрытом режиме, а также возможность регулирования и контроля основных параметров в ходе технологического процесса валидации.

Поскольку мускус кабарги представляет собой сложнейший комплекс, состоящий не только из белков, пептидов, простых и сложных липидов, стероидов, восков, ароматических соединений, сложных эфиров холестерина, но и включает в себя целые клетки, кусочки тканей, шерстинки, песчинки и др. посторонние примеси, многие способы липосомирования для этого биологического объекта не применимы. Поэтому для получения липосом, содержащих БАВ из мускуса, из существующих на сегодняшний день технологий был выбран, как наиболее перспективный, способ гомогенизации под высоким давлением.

Выбор этого метода для получения липосом определяется его высоким гомогенизирующим эффектом, возможностью максимально сохранить биологическую активность липосомлируемых компонентов, скоростью и производительностью процесса липосомирования, а также возможно-

стью масштабирования технологии в дальнейшем.

Необходимость создания отечественных устройств для приготовления специализированных гомогенных высокодисперсных эмульсий и липосомальных дисперсий медико-биологического назначения была обусловлена возрастающей потребностью в них в медицине, фармакологии и биотехнологии в последние десятилетия прошлого века. Одним из основных разработчиков данного оборудования был талантливый изобретатель Капцов В.В. (Институт биохимии клетки РАН, г. Пущино). С помощью созданного им гомогенизатора высокого давления (ГВД) «Донор» [7, 21] в этом институте впервые в мире был разработан искусственный кровезаменитель с газотранспортной функцией «Перфторан».

Дисперсность, или размер липосом в значительной степени влияет на скорость элиминации и характер распределения лекарственных веществ в организме, их концентрацию в биологических жидкостях и тканях. Эти показатели являются важным параметром, который определяет механизм интернализации клеток [14]. Показано, что частицы диаметром менее 200 нм вводятся в клетки с помощью клатрин-опосредованного эндоцитоза, а частицы размером 200–500 нм поступают через кавеоло-опосредованный эндоцитоз [24]. Установлено,

что частицы диаметром более 200 нм могут активировать систему комплемента в организме человека и удаляться из кровотока купферовскими клетками. Кроме того, во время фильтрации в селезёнке захватываются частицы, размер которых превышает 200–250 нм, а во время печёночной фильтрации задерживаются частицы диаметром более 150 нм.

Таким образом, липосомы меньшего диаметра имеют преимущество перед липосомами больших размеров, поскольку они могут избегать фагоцитоза клетками ретикулоэндотелиальной системы и способны легко проникать в межклеточное пространство. Однако необходимо учитывать, что частицы размером менее 100 нм имеют высокую тенденцию к образованию кластеров и агрегатов, которые в дальнейшем могут привести к эмболизации и вызывать инсульты, инфаркты миокарда и др. осложнения.

Субстанцию липосом, содержащую БАВ из мускуса кабарги, планируется применять для производства пероральных препаратов трансмукозального введения. Известно, что в этом случае БАВ попадают непосредственно в большой круг кровообращения в обход желудочно-кишечного тракта и минуя метаболизм первого прохода в печени. Их абсорбция осуществляется посредством пассивной диффузии через мембраны и по скорости в единицу времени превышает пероральный приём в 3–10 раз, уступая только подкожным инъекциям. Это позволяет использовать меньшее количество действующего вещества при одной и той же биодоступности или увеличивать эффективную действующую концентрацию. В связи с этим в ходе работы планировалось добиться оптимального размера основной фракции липосом в экспериментальных образцах субстанции в диапазоне 250 ± 100 нм.

Целью настоящей работы являлась разработка технологии получения стабилизи-

рованных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, с помощью гомогенизации при высоком давлении.

Материалы и методы

Для получения липосом в ходе эксперимента в качестве сырья были использованы 70% фосфатидилхолин (производство «АЛМ», Россия) и 80% фосфатидилхолин (производство «Липоид», Германия), а также концентрат БАВ из мускуса кабарги (ТУ 01.49.24-001-58709973-2017).

Получение липосом осуществляли с помощью отечественного гомогенизатора высокого давления в последней модификации «Донор-5» (рис. 2). Перед началом гомогенизации диспергируемые компоненты приготавливаемого продукта после предварительного перемешивания в механическом смесителе заливаются в расходную ёмкость. Из неё они поступают в экстразионную камеру (гомогенизирующее устройство), в которой они продавливаются через микрощель из области высокого давления (от 40 до 1000 МПа) в область нормального атмосферного давления.

Процессы диспергирования, гомогенизации или дезинтеграции осуществляются за счет резкого падения давления и действия гидродинамических сил турбулентного потока, возникающих в области микрощели. Капли или частицы, испытывая усилия растягивания и среза, дробятся на части. Величина давления характеризует степень этих усилий и служит основным технологическим показателем трудоемкости процесса. Процесс повторяется несколько раз до достижения необходимого качества продукта, в т. ч. величины липосом.

По своим технологическим параметрам гомогенизатор «Донор-5» превосходит все серийно выпускаемые отечественные и зарубежные аналоги. К его основным преимуществам относятся:

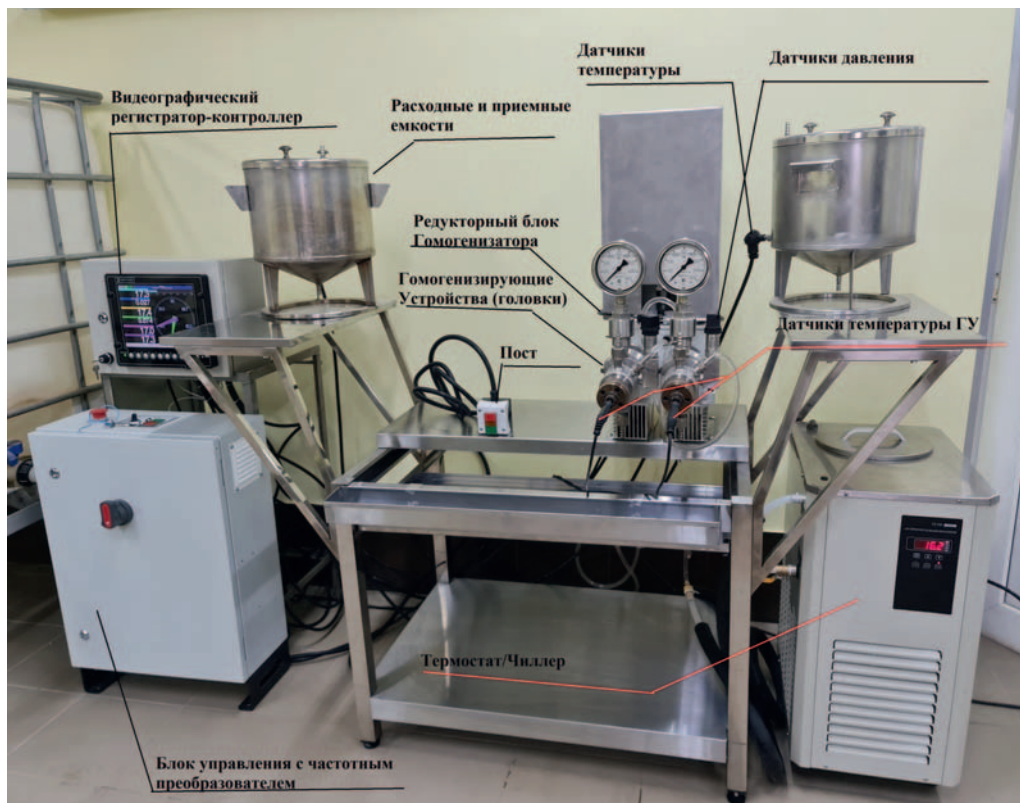


Рис. 2. Внешний вид гомогенизатора высокого давления «Донор-5». Fig. 2. External view of the high-pressure homogenizer "Donor-5".

- высокая степень разрушения клеток и тканей;
- высокая дисперсность конечных продуктов и широкий диапазон величины частиц (от 10 нм до 10 мкм);
- высокая производительность (до 25–30 л/ч), возможность приготовления малых порций продукта (100–200 мл), а также независимого приготовления двух продуктов одновременно;
- отсутствие окисляющего действия на компоненты продуктов;
- быстросъемность и автоклавируемость гомогенизирующих узлов (головок), обеспечение стерильного получения конечных продуктов;
- отсутствие загрязнения продукта механическими примесями;

- широкий диапазон регулирования давления, температуры и производительности;
- визуализация основных параметров технологического процесса и возможность его валидации;
- соответствие нормам GMP;
- небольшие габариты и масса.

Изучение подлинности (наличия липосом) проводили в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (г. Оболенск) методом негативного контрастирования в трансмиссионном электронном микроскопе Tescan G2 Spirit bioTWIN (фирма «FEI», США) при ускоряющем напряжении 120 кВт и увеличениях от 5000 до 80000 крат. Электронно-микроскопические изображения полей каждого образца, усеянных

липосомами, фотографировали с разных участков (25–30 участков) экрана микроскопа с помощью программы FEI Digital Micrograph, выбирая при этом всегда случайные поля. Полученные изображения липосом были проанализированы и обработаны с помощью программного обеспечения Tecnai Imaging & Analysis (фирма «FEI», США).

Для определения размера липосом, индекса полидисперсности и дзета-потенциала использовался метод динамического рассеяния света (ДРС) с помощью лазерного корреляционного спектрометра Photocor Compact-Z с применением программного обеспечения Photocor Software [26].

Индекс окисленности липидов в составе липосом определялся фотометрическим методом при 232 нм [2]. Определение общего белка проводили по методу Бредфорда без предварительного осаждения белка в соответствии с ГФ РФ, ЦФС. 1.2.3.0012.15 «Определение белка».

Количественное определение БАВ из мускуса кабарги и процент их включения в липосомы проводилось методами, разработанными ФМБА России [8].

Молекулярно-массовое распределение липосомальной дисперсии оценивали методом гель-размерной хроматографии (ГРХ) высокого разрешения на жидкостном ионократическом хроматографе среднего давления NGC Discovery («Bio-Rad», США). Степень включения БАВ из мускуса кабарги в липосомы определяли методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения ВЭЖХ–МС ВР 1290 QTOF 6545 XT («Agilent Technologies», США) для фракций, собранных после гель-размерной хроматографии. Маркерными компонентами включения выбраны стероидная фракция, холестерин и общий белок.

Результаты и их обсуждение

При разработке технологии получения липосом, содержащих БАВ из мускуса

кабарги, учитывались доступные отечественные и зарубежные информационные материалы, собственный практический опыт, а также технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов в условиях GMP [13].

В ходе эксперимента предварительно подготовленные 10% водные р-ры фосфолипидов и БАВ из мускуса кабарги в соотношении 5:1 подвергали гомогенизации. Получение липосом на гомогенизаторе высокого давления производили в течение 9-ти циклов по 3–5 мин каждый при температуре 33 ± 3 °С, с постепенным повышением давления от 20 до 90 МПа. В процессе гомогенизации постоянно контролировался гидродинамический диаметр образующихся липосом. Его определение проводилось с помощью анализатора размера частиц «Photocor Mini» методом лазерной дифракции света (638 нм).

Указанный параметр определяли после проведения каждого цикла, следя за тем, чтобы диаметр липосом уменьшался с каждым циклом. Это позволяет оперативно выявить нарушения регламентируемых параметров процесса: температуры, значения pH, ионной силы, давления и др. При достижении частицами среднего размера 250 ± 100 нм гомогенизацию завершали. В липосомальную дисперсию добавляли криопротектор и высушивали с помощью лиофилизации.

Для лучшего понимания процесса получения липосом следует отметить, что дисперсными системами являются гетерогенные системы из двух или большего числа фаз с сильно развитой поверхностью раздела между ними. Обычно одна из фаз образует непрерывную дисперсионную среду (в нашем случае это водно-солевой буферный р-р), в объёме которой распределена дисперсная фаза (или несколько дисперсных фаз) в виде мелких кристаллов, твёрдых аморфных частиц, капель или пузырьков (в т. ч. липосом).

В грубодисперсных системах частицы имеют размеры от 1 мкм и выше (удельная поверхность — не более $1 \text{ м}^2/\text{г}$), а в тонко- (высоко-) дисперсных, или коллоидно-дисперсных, системах — от 1 нм до 1 мкм (удельная поверхность достигает сотен $\text{м}^2/\text{г}$) [6].

Нередко в научной литературе встречаются выражения «суспензия липосом», «липосомальная эмульсия», что применительно к сложной структуре липосом не совсем верно. Так, согласно ГФ XIII, суспензия представляет собой гетерогенную дисперсионную систему, содержащую одно или несколько твёрдых действующих веществ, распределённых в жидкой дисперсионной среде, а эмульсия — гетерогенную двухфазную дисперсную систему с жидкой дисперсионной фазой и жидкой дисперсионной средой. Липосомы являются одной из разновидностей коллоидно-дисперсных систем, а именно липосомальной дисперсией.

Помимо структуры, липосомальную дисперсию от обычных крупнодисперсных жировых эмульсий отличают меньшие размеры частиц, меньшая вязкость, огромная суммарная площадь контакта со средой, большая устойчивость (т.е. не требуется введение стабилизатора-эмульгатора), от наноэмульсий — состав, а от грубых, быстро оседающих суспензий с низкой кинетической устойчивостью — условия высокоскоростной дисперсности.

На стадии разработки и получения липосомальной лекарственной формы (ЛФ) очень важна характеристика и оценка агрегативной и кинетической (седиментационной) устойчивости (стабильности) полученного продукта [3]. Различная диспергируемость частиц мускуса при одинаковых условиях измельчения определяется их структурой, механической прочностью и механизмом диспергирования в различных экстрагирующих буферных растворах. Этот процесс чрезвычайно важен не только для полноты извлечения био-

логически активных компонентов, но и для проведения при необходимости дальнейшего их выделения и очистки.

Таким образом, одним из основных показателей, определяющим подбор технологического оборудования для дальнейшего производственного процесса получения липосом и последующую биологическую активность фармацевтической субстанции на основе мускуса кабарги, является степень дисперсности получаемой суспензии (средний размер частиц и их распределение по размерам).

Несомненную практическую значимость на стадии разработки и получения липосомальной ЛФ представляет характеристика и оценка устойчивости полученного продукта по трём основным показателям — размеру везикул, индексу полидисперсности и дзета-потенциалу [22, 23, 25, 27].

Размер липосом применяется как основной показатель качества, определяющий стабильность производимой субстанции и её биодоступность. Это обусловлено тем, что изменение дисперсности влияет на агрегатное состояние дисперсионной фазы. Необходимо отметить естественное стремление липосом к формированию более крупных структур (конъюгатов, агломератов и т.п.). К этому их принуждают силы поверхностной активности, не уравновешенные внутренним состоянием атомарно-молекулярного взаимодействия.

Размер частиц зависит от двух основных факторов — компонентного состава (концентрации и свойств активного и вспомогательных веществ) и технологии получения. На размер липосом влияет также концентрация и соотношение твёрдых и жидких липидов. Отмечено, что увеличение общей концентрации липидов, а также доли твёрдых липидов в составе относительно жидких способствует увеличению размера липосом.

Пример отображения экспериментальных данных о количественном распределе-

нии размеров липосом, полученных с помощью анализатора «Photocog», приведён на рис. 3 и 4. В липосомальной дисперсии мускуса кабарги, на основе 70% и 80% фосфатидилхолина, 95,9% составляют частицы с размером 131 ± 30 нм и 92,7% соответственно 120 ± 28 нм. Сравнение результатов свидетельствует о том, что применение отечественного фосфатидилхолина позволяет получать липосомы необходимого качества.

Результаты исследования восстановленных образцов сублимированных липосом (табл. 1) подтверждают, что размеры частиц после повторного растворения в воде не изменяются.

В большинстве наномолекулярных и нанодисперсных систем молекулы и частицы неодинаковы. При описании свойств систем необходимо использовать функции распределения частиц по их параметрам, т.е. при исследовании реальных систем учитывать их полидисперсность, т.к. монодисперсные приближения могут приводить к неверным заключениям о свойствах частиц. Ширину распределения частиц по размерам характеризуют по индексу полидисперсности (polydispersity index — PDI).

Значения PDI ранжируются от нуля до единицы. Чем ближе значение PDI к нулю, тем частицы более гомогенные. Как и размер частиц, значение PDI зависит от состава продукта и способа получения липосом и является очень чувствительным к присутствию агрегатов или загрязнений (пыли, инородных объектов). Ожидаемое значение PDI для монодисперсных образцов не должно превышать 0,5.

Экспериментальные данные, полученные с помощью анализатора «Photocog» и приведённые в табл. 1, показывают, что этот параметр в экспериментальных образцах липосомальной субстанции соответствует установленной норме.

Дзета (Z)-потенциал — один из основных параметров, влияющих на стабильность

дисперсных систем. Он является важнейшим индикатором поверхностного заряда липосом и мерой электростатического взаимодействия (отталкивания или притяжения) между частицами. Согласно физической теории устойчивости коллоидных систем ДЛФО (теория Дерягина, Ландау, Фервея и Овербека), стабильность коллоидных систем определяется двойным электрическим слоем (т.н. «энергетическим барьером») и образованием ван-дер-ваальсовых сил, которые обуславливают приближение частиц друг к другу. Если этот энергетический барьер, представленный силами отталкивания, будет преодолен за счёт сил Ван-дер-Ваальса, частицы будут взаимодействовать друг с другом и слипаться, что является нежелательным для липосомальных систем доставки различных ЛВ. Кроме того, измерение дзета-потенциала — одна из возможностей сокращения периода проверки стабильности липосомальных ЛВ за счёт уменьшения длительности и затрат на тестирование и увеличение срока хранения.

Экспериментальные данные, полученные с помощью анализатора «Photocog» и приведённые в табл. 1, показывают, что дзета-потенциал в образцах липосомальной субстанции соответствует установленной норме.

Свойства липосом во многом определяются жирнокислотным составом и химическим состоянием липидов, входящих в их состав. Основным деструктивным процессом в липидах является окисление, поэтому они должны быть минимально окислены по двойным связям. Обнаружено, что в процессе хранения липосомального препарата pH среды в контроле снижается. Это объясняется тем, что в процессе окисления липидов наблюдается возрастание концентрации карбоновых кислот, детектирование которых проводят фотометрически. Существуют экспериментально подтвержденные рекомендации о том, что для по-

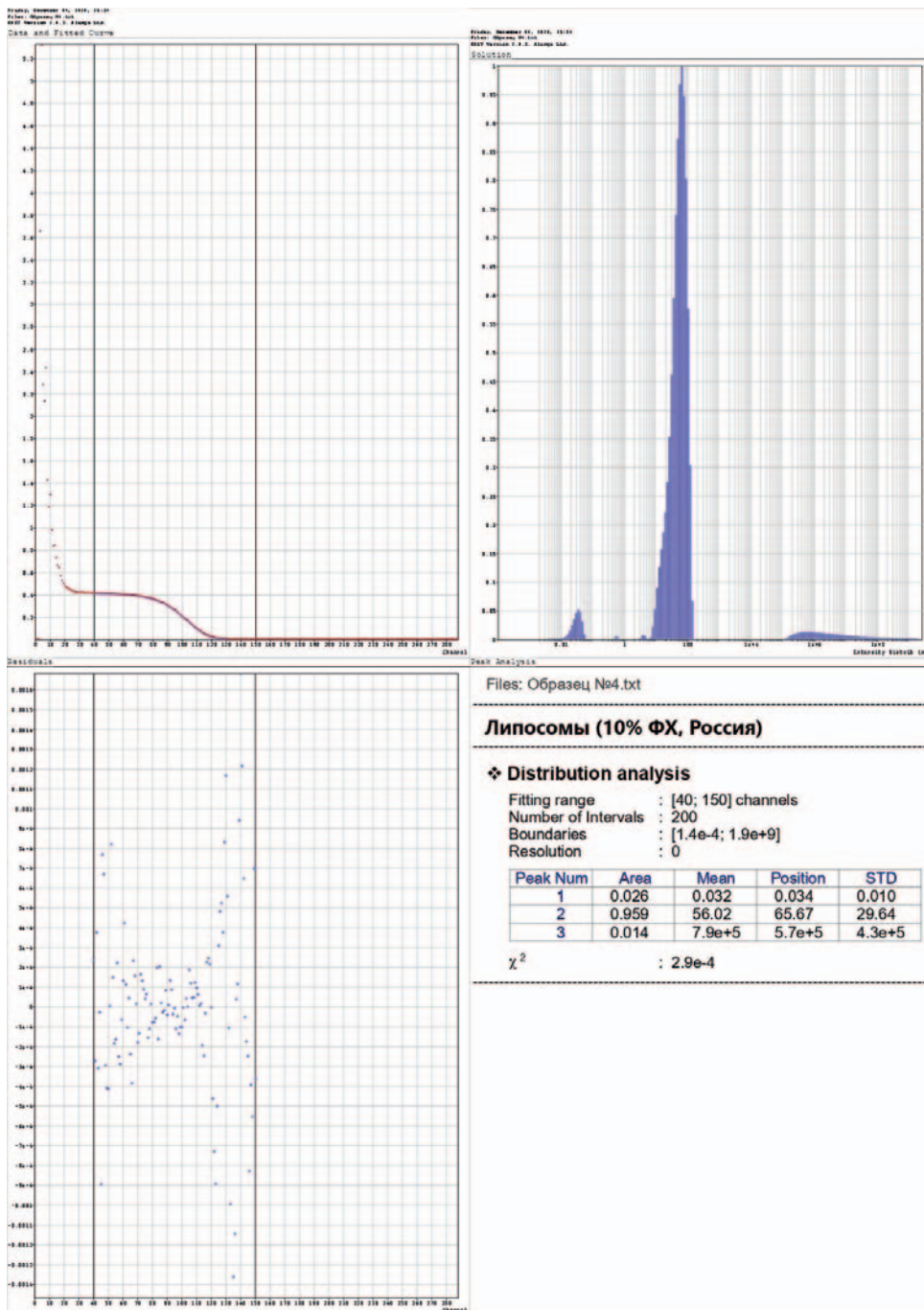


Рис. 3. Среднее интегральное значение размера частиц 10% исходного р-ра липосом мускуса кабарги, полученных на основе 70% фосфатидилхолина (Россия).
Fig. 3. Mean integral value of the particle size of a 10% precursor solution of musk liposomes obtained on the basis of 70% phosphatidylcholine (Russia).

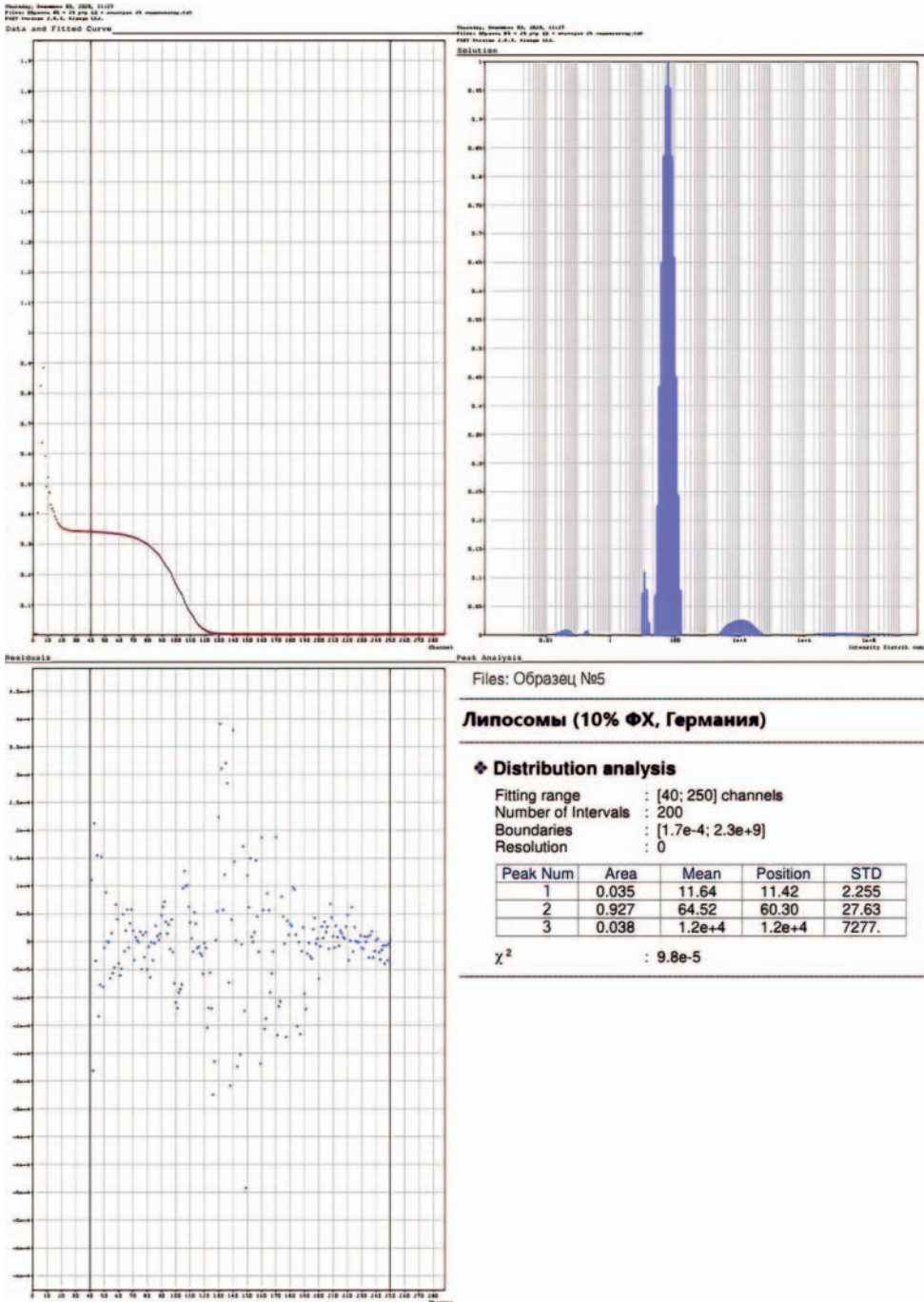


Рис. 4. Среднее интегральное значение размера частиц 10% исходного р-ра липосом мускуса кабарги, полученных на основе 80% фосфатидилхолина (Германия).
Fig. 4. Mean integral value of the particle size of a 10% precursor solution of musk liposomes obtained on the basis of 80% phosphatidylcholine (Germany).

Таблица 1. Размер, вариабельность и дзета-потенциал частиц в восстановленных образцах липосомальной субстанции мускуса

Table 1. Particle size, variability, and zeta potential in reduced musk liposomal substance samples

Показатели	Норма	Образец № 1	Образец № 2
Размер частиц, нм	250±100	175 (75%)	240 (65%)
Индекс полидисперсности	менее 0,5	0,33	0,32
Дзета-потенциал, мВ	-5...-35	-25	-33
Индекс окисленности	не более 0,5	0,31	0,34

лучения липосом необходимо применять фосфолипидное сырье с индексом окисленности не выше 0,5. С целью предотвращения и замедления процессов окисления не только фосфолипидов бислоя липосом, но и большого числа различных БАВ липидной природы, содержащихся в мускусе кабарги, в состав липосом были добавлены антиоксиданты (антиокислители и ингибиторы окисления).

При отработке получения липосом методом гомогенизации под высоким давлением было установлено (табл. 1), что индексы окисленности экспериментальных образцов отличаются незначительно (от 0,28 до 0,34) и соответствуют заданному параметру.

На этапе первичной оценки липосомальной формы необходимо удостовериться, что в её составе действительно присутствуют липосомы. Основным методом определения присутствия липосом и морфологии их поверхности является электронная ми-

кроскопия, которая одновременно предоставляет информацию о форме, структуре и размере липосом.

На рис. 5 приведен снимок, полученный с помощью электронной микроскопии, на котором хорошо видны микронных размеров частицы исходного концентрата мускуса до его гомогенизации и липосомирования.

Исследования в электронном микроскопе структуры дисперсии липосом, содержащих БАВ мускуса, до лиофильной сушки показали, что липосомы в образце представляют собой везикулы регулярной округлой, овальной и очень редко каплевидной формы диаметром от 50 до 1000 нм (рис. 6). При этом липосомы диаметром от 50 до 200 нм составляют около 60% от всех липосомальных частиц в образце (рис. 7).

Во внутренней структуре липосом видны мелкие образования нерегулярной формы с разной электронно-оптической плотно-

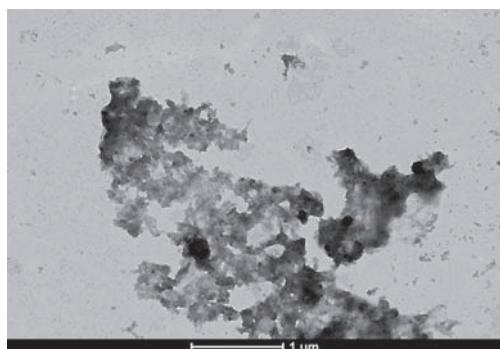


Рис. 5. Микрофотография частиц исходного концентрата мускуса кабарги.

Fig. 5. Micrograph of particles of the precursor deer musk concentrate.

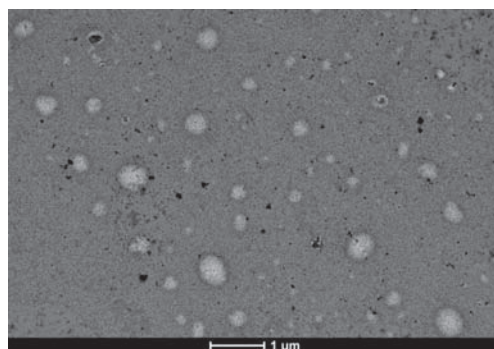


Рис. 6. Микрофотография липосом в исходной липосомальной дисперсии.

Fig. 6. Micrograph of liposomes in the precursor liposomal dispersion.

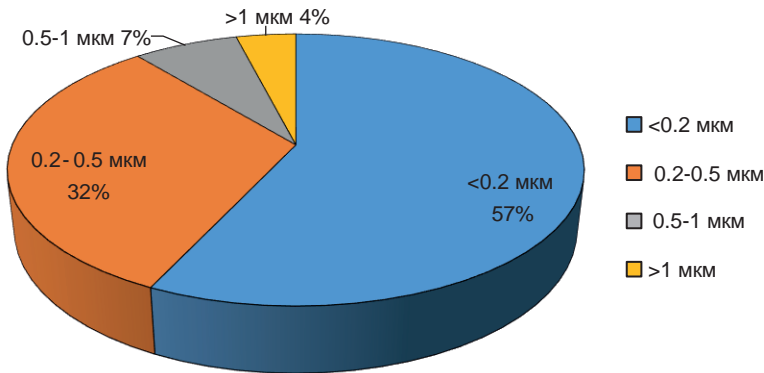


Рис. 7. Распределение частиц в исходной липосомальной дисперсии.
Fig. 7. Particle distribution in the precursor liposomal dispersion.

стью диаметром 5–20 нм — по всей вероятности, частицы БАВ мускуса.

На микрофотографиях (рис. 6 и 8) представлены данные о морфологии и гидродинамическом диаметре (размере) частиц двух восстановленных в воде липосомальных образцов мускуса, полученных при помощи гомогенизации под высоким давлением. На них чётко видны отдельные монослоевые липосомы сферической формы. Липосомы размером от 100 до 300 нм хорошо окрашены гидрофильными (внутренний объем везикул) и гидрофобными (пространство внутри бислоя везикул, образованного фосфолипидами) компонентами, входящими в состав мускуса кабарги. Диаграммы распределе-

ния частиц по размерам (рис. 7 и 9) также показывают, что основная фракция липосом представлена частицами с диаметром около 200 нм. Важно подчеркнуть, что эти данные хорошо коррелируют с результатами, полученными с помощью анализатора размеров частиц (табл. 2).

Изображения на рис. 8 и 10 свидетельствуют, что липосомальная форма субстанции сохраняется и после восстановления лиофилизированного порошка липосом мускуса.

Необходимо отметить, что возможны основные четыре пути включения БАВ в липосомы: водорастворимые вещества включаются во внутренний водный объём, в гидрофобную область бислоя, адсорбируются на поверхности либо химически связываются с компонентами бислоя. Возможна также комбинация способов включения, особенно для БАВ из мускуса, который содержит огромный спектр органических соединений гидрофильной и гидрофобной природы.

В составе мускуса можно выделить три группы соединений с наиболее выраженным биологическим эффектом: стероидные компоненты, жирные кислоты, пептиды и белки [8, 9, 10]. Поэтому продолжение исследований по разработке методов количественной оценки включения основных

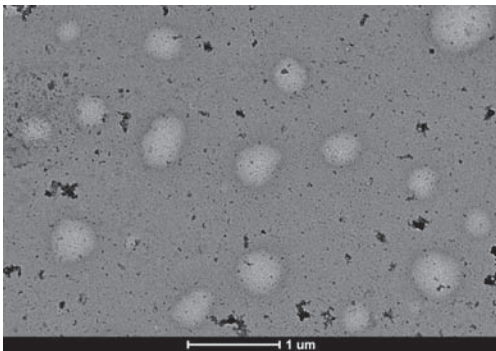


Рис. 8. Микрофотография восстановленных липосом (образец № 1).

Fig. 8. Micrograph of reduced liposomes (sample No. 1).

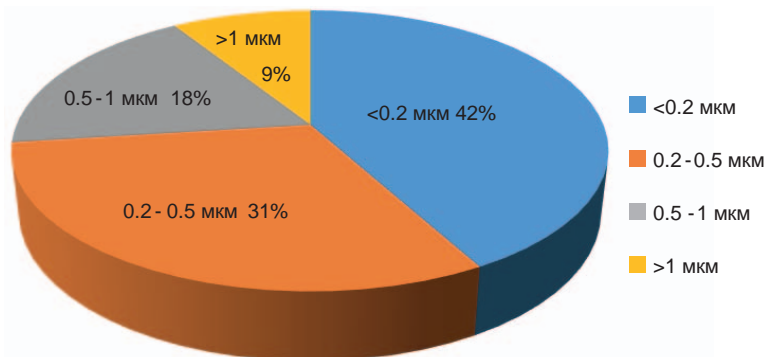


Рис. 9. Распределение частиц по размерам в р-ре восстановленных липосом (образец № 1).
Fig. 9. Particle size distribution in a solution of reduced liposomes (sample No. 1).

фармацевтически активных компонентов мускуса в липосомы является актуальным.

Изучение основных параметров, характеризующих качество липосомальной субстанции (подлинность, процент включения БАВ и их количественное определение), проведенное в ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» (табл. 2), свидетельствует о том, что более 60% БАВ из мускуса кабарги включается в липосомы.

На основании вышеизложенных литературных данных, результатов собственных исследований (рис. 11–13), а также «Требований к показателям качества и исследованию лекарственных средств на основе липосом, мицелл и лекарственных средств, содержащих покрытие из наночастиц» разработан проект спецификации

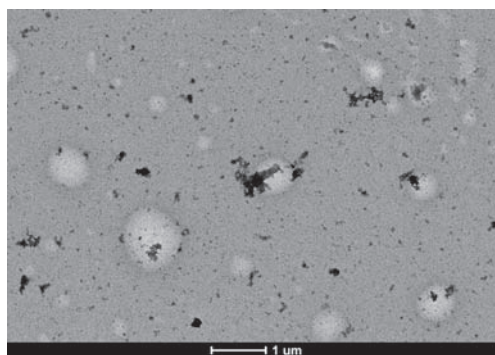


Рис. 10. Микрофотография восстановленных липосом (образец № 2).

Fig. 10. Micrograph of reduced liposomes (sample No. 2).

(табл. 2) на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги (рис. 14).

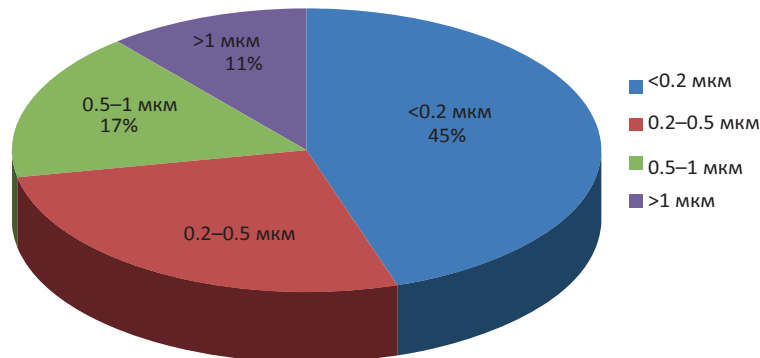


Рис. 11. Распределение частиц по размерам в растворе восстановленных липосом (образец № 2).

Fig. 11. Particle size distribution in a solution of reduced liposomes (sample No. 2).

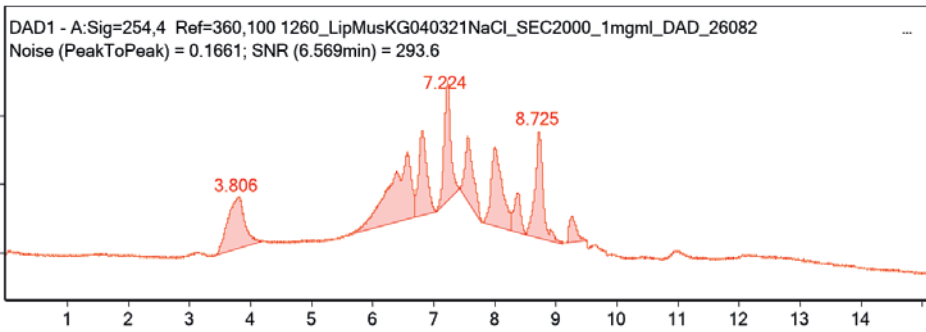


Рис. 12. Препаративная гель-размерная хроматограмма р-ра липосом мускуса кабарги.
Fig. 12. Preparative gel-size chromatogram of the deer musk liposome solution under study.

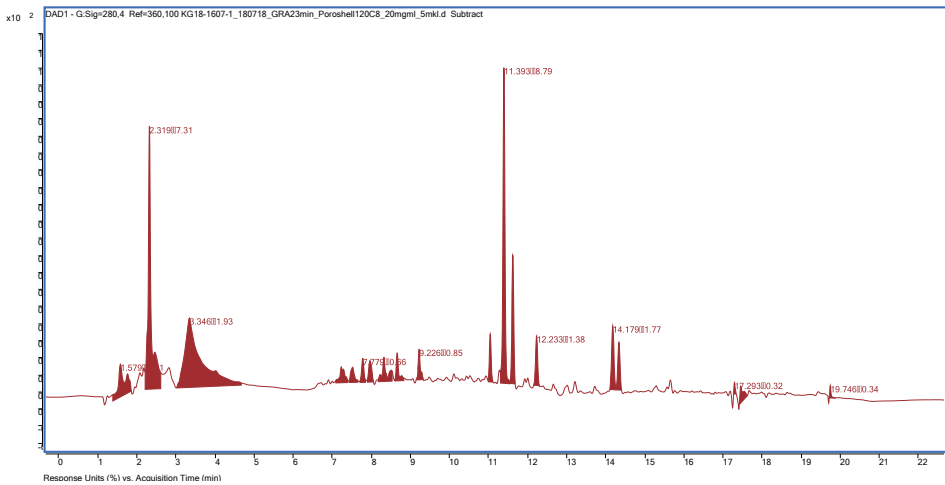


Рис. 13. Типичная ВЭЖХ-УФ хроматограмма компонентов БАВ липосом мускуса кабарги.
Fig. 13. Typical HPLC-UV chromatogram of biologically active substances of deer musk liposomes.



Рис. 14. Экспериментальный образец липосомированной субстанции мускуса.
Fig. 14. Experimental sample of the liposomal musk substance under study.

Таблица 2. Проект спецификации на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги

Table 2. Draft specification for a liposomal substance (powder) containing a complex of biologically active substances isolated from musk of musk deer

Показатель	Метод	Норма
Описание	Органолептический ГФ XIII, ОФС 1.1.0006.15, ч. 1	Лиофилизированный аморфный порошок светлокоричневого цвета с характерным запахом и вкусом мускуса
Растворимость	ГФ РФ XIII, ОФС 1.2.1.0005.15, ч. 1, с. 531	Мало растворим в воде, мало растворим в спирте 96%, практически не растворим в гексане
Подлинность: - присутствие липосом; - наличие БАВ мускуса	Электронная микроскопия (метод негативного контрастирования) ГХ–МС (ГХ–ПИД) ВЭЖХ-УФ	Моноламеллярные липосомы сферической формы Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого р-ра должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца липосом мускуса кабарги Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого р-ра должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца липосом мускуса кабарги
Размер частиц	ГФ XII, ч. 2 Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	50–500 нм
Индекс полидисперсности	Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	0,5±0,1
Дзета-потенциал	Динамическое светорассеяние	– 5...–35 мВ
Степень включения БАВ мускуса	Гель-хроматография ВЭЖХ–МС	Не менее 50% Не менее 50%
Индекс окисленности	Спектрофотометрия	Не более 0,5
рН	ГФ РФ, ОФС 1.1.0006.15 (потенциометрический метод)	От 6,0 до 8,0 (1% р-р)
Вода	ГФ РФ, ОФС 1.2.3.0002.15	Не более 5,0%
Общий белок	ГФ РФ, ОФС. 1.2.3.0012.15 Метод Бредфорд (колориметрический)	Не более 4%
Сульфатная зола	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0014.15	Не более 5,0%
Тяжелые металлы	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0012.15	Не более 0,002%
Остаточные органические растворители	ГХ РФ	Этанол — не более 0,5%; изопропилового спирта — не более 0,5%
Микробиологическая чистота	ГФ РФ, ОФС. 1.2.4.0002.15	Категория 3.2
Количественное определение	ВЭЖХ	Не менее 90,0% и не более 110,0% в пересчете на безводное вещество
Хранение	В сухом защищенном от света месте при температуре не выше 20 °С	
Срок годности	Устанавливается	

Выводы

1. Гомогенизация под высоким давлением является оптимальным способом получения стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги.

2. На основании проведённых исследований разработаны режимы приготовления липосомальной формы БАВ с заранее заданными параметрами дисперсности (средним диаметром частиц 250 ± 100 нм, индексом полидисперсности $0,3 \pm 0,1$ и дзета-потенциалом от -5 до -35 мВ).

3. Гомогенизатор высокого давления «Донор-5» позволяет получать липосомальные дисперсии со стандартными параметрами и степенью включения БАВ

мускуса до 60%, а также обеспечивает минимальное окисление и гидролиз фосфолипидов (индекс окисленности 0,3).

4. На основании полученных результатов разработан проект спецификации на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги.

5. Использование отечественного фосфатидилхолина является экономически оправданным и позволяет получать липосомальные формы надлежащего качества.

6. Разработанную технологию получения липосомальной формы БАВ из мускуса кабарги можно масштабировать в соответствии с требованиями GMP.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Баллюзек Ф.К., Куркаев А.С., Сенте Л. *Нанотехнологии для медицины*. СПб.: Сесам-Принт, 2008:104. [Ballyuzek F.K., Kurkayev A.S., Sente L. *Nanotekhnologii dlya meditsiny* [Nanotechnology for medicine]. Saint-Petersburg: Sesam-Print Publ., 2018:104. (In Russian)].
2. Боршевский Г.И. Определение индекса окисленности липосомальных наночастиц. *Химия и химические технологии*. 2015;9:25–26. [Borshchevskiy G.I. Opredeleniye indeksa okislennosti liposomal'nykh nanoplastits [Determination of the oxidation index of liposomal nanoparticles]. *Khimiya i khimicheskiye tekhnologii* [Chemistry and chemical technologies]. 2015;9:25–26. (In Russian)].
3. Боршевський Г.І., Комаров І.В., Кулініч А.В. Фактори, які впливають на стабільність препарату Лесфаль. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2013;6:10–14. [Borshchev'skiy G.I., Komarov I.V., Kulinich A.V. Faktory, yaki vplyvayut' na stabil'nist' preparatu Lesfal' [Factors affecting the stability of the drug Lesfal]. *Upravlinnya, ekonomika ta zabezpechennya yakosti v farmatsiyi* [Management, economics and quality assurance in pharmacy journal]. 2013;6:10–14. (In Ukrainian)].
4. Быковский С.Н., Василенко И.А., Демина Н.Б., Шохин И.Е., Новожилов О.В., Мешковский А.П., Спицкий О.Р. *Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практ. рук-во для фармацевтической отрасли*. М.: Перо, 2015:472. [Bykovskiy S.N., Vasilenko I.A., Demina N.B., Shokhin I.Ye., Novozhilov O.V., Meshkovskiy A.P., Spitskiy O.R. *Farmatsevticheskaya razrabotka: kontseptsiya i prakticheskiye rekomendatsii. Nauchno-prakt. ruk-vo dlya farmatsevticheskoy otrasli* [Pharmaceutical Development: Concept and Practical Guidelines. Scientific and practical guide for the pharmaceutical industry]. Moscow: Pero Publ., 2015:472. (In Russian)].
5. Грегориадис Г., Аллисон А. *Липосомы в биологических системах*. М.: Медицина, 1983:384. [Gregoriadis G., Allison A. *Liposomy v biologicheskikh sistemakh* [Liposomes in biological systems]. Moscow: Medicine Publ., 1983:384. (In Russian)].
6. Зефи́ров Н.С., Кнунянц И.Л., Кулов Н.Н. *Химическая энциклопедия*. М.: Советская энциклопедия. 1990:80–82. [Zefirov N.S., Knunyants I.L., Kulov N.N. *Khimicheskaya entsiklopediya* [Chemical encyclopedia]. Moscow: Soviet encyclopedia Publ., 1990:80–82. (In Russian)].
7. Капцов В.В., Алымов А.В., Шибаяев Н.В., Кукушкин В.И., Маевский Е.И. Выбор способов и устройств диспергирования для приготовления газопереносящих эмульсий ПФС. *ВИНИТИ*. 1984;148. [Kaptsov V.V., Alymov A.V., Shibayev N.V., Kukushkin V.I., Mayevskiy Ye.I. Vybory sposobov i ustroystv dispergirivaniya dlya prigotovleniya gazopere-nosyashchikh emul'siy PFS [The choice of methods and devices for dispersing for the preparation of gas-transfer emulsions PFC]. *VINITI* [VINITI J.]. 1984;148. (In Russian)].
8. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л., Каркищенко Н.Н. Липосомированная форма экстракта препуциальной железы кабарги — новое средство адаптогенного действия. *Биомедицина*. 2019;15(4):34–45. [Karkischenko V.N., Dulya M.S.,

- Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L., Karkischenko N.N. Liposomirovannaya forma ekstrakta preputzial'noy zhelezy kabargi — novoye sredstvo adaptogenno deystviya [A liposomal composition of musk deer preputial gland extract as a new agent of adaptogenic]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(4):34–45. (In Russian)].
9. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А. Люблинский С.Л. Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги *Moschus moschiferus* методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. *Биомедицина*. 2018;1:34–45. [Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L. Analiz biologicheskii aktivnykh soyedineniy muskusa kabargi *Moschus Moschiferus* metodom gazovoy khromatografii s mass-selektivnym detektorom [Analysis of biologically active musk compounds of musk deer (*Moschus Moschiferus*) by gas chromatography with mass selective detector]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2018;1:34–45. (In Russian)].
10. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л., Каркищенко Н.Н. Протеомный анализ в идентификации белковых компонентов препуциальной железы кабарги сибирской. *Биомедицина*. 2019;15(1):34–45. [Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L. Proteomnyy analiz v identifikatsii belkovykh komponentov preputzial'noy zhelezy kabargi sibirskoy [Proteomic analysis in the identification of active components in the preputial gland secretion of the Siberian musk deer]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(1):34–45. (In Russian)].
11. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б. *Фармакологические основы терапии*. Тезаурус. Изд. 3-е — новая ред. М., СПб: Айсинг, 2018:288. [Karkischenko V.N., Karkischenko N.N., Shustov E.B. *Farmakologicheskie osnovy terapii [The pharmacological therapeutics basis]*. Thesaurus. Ed. 3th — new ed. Moscow, Saint-Petersburg: Ajsing Publ., 2018:288. (In Russian)].
12. Краснополянский Ю.М., Дудниченко А.С., Швец В.И. *Фармацевтическая биотехнология: бионанотехнология в фармации и медицине*. Харьков: Издательский центр НТУ «ХПИ», 2011:227. [Krasnopol'skiy Yu.M., Dudnichenko A.S., Shvets V.I. *Farmatsevticheskaya biotekhnologiya: bionanotekhnologiya v farmatsii i meditsine [Pharmaceutical biotechnology: bionanotechnology in pharmacy and medicine]*. Kharkov: Publishing Center NTU "KhPI", 2011:227. (In Russian)].
13. Краснополянский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов в условиях GMP. *Биофармацевтический журнал*. 2009;1(3):18–29. [Krasnopol'skiy Yu.M., Stepanov A.Ye., Shvets V.I. Tekhnologicheskiye aspekty polucheniya liposomal'nykh preparatov v usloviyakh GMP [Technological aspects of obtaining liposomal preparations under GMP conditions]. *Biopharmaceutical journal*. 2009;1(3):18–29. (In Russian)].
14. Кузякова Л.М., Ефременко В.И. *Медикаментозное преодоление анатомических и клеточных барьеров с помощью липосом*. Ставрополь: Б.и., 2000:169. [Kuzyakova L.M., Yefremenko V.I. *Medikamentoznoye preodoleniye anatomicheskikh i kletochnykh bar'yerov s pomoshch'yu liposom [Drug overcoming of anatomical and cellular barriers using liposomes]*. Stavropol: B.I., 2000:169. (In Russian)].
15. Посте Дж. Взаимодействие липидных везикул (липосом) с клетками в культуре и их использование как переносчиков лекарств и макромолекул. В кн.: *Липосомы в биологических системах*. М.: Медицина, 1988:107–155. [Poste Dzh. Vzaimodeystviye lipidnykh vezikul (liposom) s kletkami v kul'ture i ikh ispol'zovaniye kak perenoschikov lekarstv i makromolekul [Interaction of lipid vesicles (liposomes) with cells in culture and their use as carriers of drugs and macromolecules]. V kn.: *Liposomy v biologicheskikh sistemakh [In the book: Liposomes in biological systems]*. Moscow: Medicine Publ., 1988:107–155. (In Russian)].
16. Рингсдорф Г., Шмидт Б. Системы полимерных носителей лекарств. *Журнал всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева*. 1987;32(5):487–501. [Ringsdorf G., Shmidt B. Sistemy polimernykh nositeley lekarstv [Systems of polymer carriers of drugs]. *Zhurnal vsesoyuznogo khimicheskogo obshchestva im. D.I. Mendeleeva [Journal of the All-Union Chemical Society named after D.I. Mendeleev]*. 1987;32(5):487–501. (In Russian)].
17. Сейфулла Р.Д. *Фармакология липосомальных препаратов*. М.: Глобус Континенталь, 2010:241. [Seyfulla R.D. *Farmakologiya liposomal'nykh preparatov [Pharmacology of liposomal preparations]*. Moscow: Globus Continental Publ., 2010:241. (In Russian)].
18. Уйба В.В., Котенко К.В., Коржачкина Н.Б., Петрова Н.Б., Михайлова А.А. *Применение мускуса кабарги в клинической практике*. Метод. реком. М., 2013:18. [Uyba V.V., Kotenko K.V., Korzhachkina N.B., Petrova N.B., Mikhaylova A.A. *Primeneniye muskusa kabargi v klinicheskoy praktike [Application of musk of musk deer in clinical practice]. Methodical recommendations*. Moscow, 2013:18. (In Russian)].
19. Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Торчилин В.П. Липосомы как средство направленного транспорта лекарств. *Журнал всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева*, 1987;32(5):502–513. [Chazov Ye.I., Smirnov V.N., Torchilin V.P. Liposomy kak sredstvo napravlennogo transporta lekarstv [Liposomes as a Means of Directed Transport of Drugs]. *Zhurnal vsesoyuznogo khimicheskogo ob-*

- shchestva im. D.I. Mendeleeva [Journal of the All-Union Chemical Society named after D.I. Mendeleev]. 1987;32(5):502–513. (In Russian)].*
20. Швец В.И., Краснополянский Ю.М., Сорокумова Г.М. *Липосомальные формы лекарственных препаратов: технологические особенности получения и применения в клинике.* М.: Ремедиум, 2017:197. [Shvets V.I., Krasnopol'skiy Yu.M., Sorokoumova G.M. *Liposomal'nyye formy lekarstvennykh preparatov: tekhnologicheskiye osobennosti polucheniya i primeneniya v klinike [Liposomal forms of drugs: technological features of production and use in the clinic].* Moscow: Remedium Publ., 2017:197. (In Russian)].
 21. Kaptsov V.V. Production PPG submicron emulsions and liposomes with high pressure homogenizer. "Donor-1". *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology*, 1994;22(5):110.
 22. Kaszuba M., McKnight D., Connah M.T., McNeil-Watson F.K., Nobbmann U. Measuring sub nanometer sizes using dynamic light scattering. *J. of Nanoparticle Research*, 2008;10:823–829.
 23. Mahmud M., Piwoni A., Filipczak N., Janicka M., Gubernator J. Long-Circulating Curcumin-Loaded Liposome Formulations with High Incorporation Efficiency, Stability and Anticancer Activity towards Pancreatic Adenocarcinoma Cell Lines in vitro. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167787.
 24. Rejman J., Oberle V., Zuhom I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clatrin and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. Journal*, 2004;377(1):159–169.
 25. Tohver V., Smay J.E., Braem A., Braun P.V., Lewis J.A. Nanoparticle halos: A new colloid stabilization mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001;98(16):8950–8954.
 26. https://bio.pnpi.nrcki.ru/wp-content/uploads/2020/01/Photocor-Compact-Z_Manual.pdf
 27. <https://www.malvernpanalytical.com/ru/products/measurement-type/zeta-potential>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Люблинский Станислав Львович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Люблинская Ирина Николаевна*, ООО «Научно-производственная фирма «МОБИТЕК-М»»;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., ООО «Научно-производственная фирма «МОБИТЕК-М»»;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Азизов Ариф Мурсали Оглы, ООО «Научно-производственная фирма «МОБИТЕК-М»»;

e-mail: ximreaktiv@gmail.com

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: scbmt@ya.ru

Нестеров Максим Сергеевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: mdulya@gmail.com

Капцов Александр Владимирович, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: a_v_kaptsov@mail.ru

Stanislav L. Lyublinskiy, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Irina N. Lyublinskaya*, Scientific and Production Company «МОБИТЕК-М»;

e-mail: mobitek-m@mail.ru

Elena M. Koloskova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific and Production Company «МОБИТЕК-М»;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Arif M. Azizov, Scientific and Production Company «МОБИТЕК-М»;

e-mail: ximreaktiv@gmail.com

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: scbmt@ya.ru

Maksim S. Nesterov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: mdulya@gmail.com

Alexander V. Kaptsov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: a_v_kaptsov@mail.ru

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»; ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Герасимов Владимир Николаевич, д.б.н., ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»;
e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

Гриненко Дмитрий Владимирович, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»;
e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia; Mendeleev University Chemical Technology of Russia;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Vladimir N. Gerasimov, Dr. Sci. (Biol.), State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology;
e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

Dmitrii V. Grinenko, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology;
e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ВЛИЯНИЕ АДАПТОГЕНОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОЕ РУСЛО У КРЫС

А.А. Блажко^{1*}, И.И. Шахматов¹, В.М. Вдовин¹, Ю.А. Бондарчук¹, Н.А. Лычева²,
С.В. Москаленко¹, И.Н. Манаева¹

¹ ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России
656038, Российская Федерация, Алтайский край, Барнаул, просп. Ленина, 40

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

Продукты пантового оленеводства являются адаптогенами животного происхождения, которые могут усиливать физическую и умственную работоспособность организма. Продукты на основе крови марала и гистолызата из их половых органов имеют более значимый тонизирующий эффект. Исследования выполнялись на 40 белых самцах крыс Wistar массой 230±20 г. Животных разделили на 3 группы: интактная группа (n=20); контрольная группа (n=10); экспериментальная группа (n=10). Крысы экспериментальной группы принимали «Пантогематоген (Лубяньгем)» (2 мл на 100 г массы тела) в течение 30-ти дней, контрольная группа животных принимала водный раствор добавок концентрата, интактные животные принимали воду в том же объеме. На 31-й день эксперимента у всех животных проводилось исследование показателей микроциркуляции методом лазерной доплеровской флоуметрии. У крыс экспериментальной группы, принимавших концентрат в течение 30-ти дней, отмечалось повышение модуляции кровотока на 97% (p=0,006), повышение амплитуды эндотелиальных колебаний на 71% (p=0,007) и повышение амплитуды вазомоторных волн на 45% (p=0,019) относительно интактных животных, что свидетельствует об увеличении интенсивности функционирования «активных» механизмов регуляции микроциркуляции.

Ключевые слова: микроциркуляция, флоуметрия, пантовое оленеводство

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Блажко А.А., Шахматов И.И., Вдовин В.М., Бондарчук Ю.А., Лычева Н.А., Москаленко С.В., Манаева И.Н. Влияние адаптогенов животного происхождения на микроциркуляторное русло у крыс. *Биомедицина*. 2021;17(4):38–43. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-38-43>

Поступила 01.05.2021

Принята после доработки 30.06.2021

Опубликована 10.12.2021

IMPACT OF ADAPTOGENS OF ANIMAL ORIGIN ON MICROCIRCULATION IN RATS

Alexander A. Blazhko^{1*}, Igor I. Shakhmatov¹, Vyacheslav M. Vdovin¹,
Yulia A. Bondarchuk¹, Natalia A. Lycheva², Svetlana V. Moskalenko¹, Irina N. Manaeva¹

¹ Altai State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
656038, Russian Federation, Altai Region, Barnaul, Lenin Avenue, 40

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

Velvet antler products are adaptogens of animal origin, capable of increasing the physical and mental capacity of the body. It is known that the velvet antler products based the maral blood and a histolysate obtained

from the genitals of males exhibit a more pronounced revitalizing effect. Experiments were conducted on 40 mature white male Wistar rats weighing 230 ± 20 g, divided into 3 groups: intact group ($n=20$); control group ($n=10$); experimental group ($n=10$). The experimental group received a concentrate Pantoohematogen (Lubyan'gem) at a dose of 2 ml per 100 g of body weight for 30 days; the control group – an aqueous solution of concentrate additives; the intact animals – water in the same volume. On the 31st day of the experiment, the microcirculation indicators of all animals were studied by laser doppler flowmetry. In comparison with intact animals, the rats of the experimental group receiving the concentrate for 30 days showed an increase in the blood flow modulation by 108% ($p=0.006$), in the amplitude of endothelial fluctuations by 71% ($p=0.006$), and in the amplitude of vasomotor waves by 45% ($p=0.024$). This indicates an intensification of the “active” mechanisms of microcirculation regulation.

Keywords: microcirculation, flowmetry, velvet antler

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

For citation: Blazhko A.A., Shakhmatov I.I., Vdovin V.M., Bondarchuk Yu.A., Lycheva N.A., Moskalenko S.V., Manaeva I.N. Impact of Adaptogens of Animal Origin on Microcirculation in Rats. *Journal Biomed.* 2021;17(4):38–43. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-38-43>

Submitted 01.05.2021

Revised 30.06.2021

Published 10.12.2021

Введение

Микроциркуляторное русло является важнейшим звеном сердечно-сосудистой системы, которое выполняет транспортную функцию и транскапиллярный обмен. Регуляторные механизмы функционирования зоны микроциркуляции определяют эффективность процесса адаптации всего организма к физическим тренировкам и другим видам стрессорного воздействия [5]. Т.о., поиск способов и изучение механизмов повышения устойчивости микроциркуляторного русла к различным стрессорным воздействиям являются актуальными вопросами физиологии, восстановительной и спортивной медицины.

Для повышения стрессоустойчивости организма и микроциркуляторного русла могут быть использованы адаптогены животного происхождения. Так, например, прием продуктов на основе крови марала усиливает физическую и умственную работоспособность организма, изменяет гормональный фон, повышает показатель гематокрита за счет усиления выработки эритропоэтина и тестостерона [8]. При изучении адаптивного влияния различных видов и комбинаций продуктов пантового оленеводства

было выявлено, что продукты, содержащие помимо крови ещё и гистолитат из половых органов самцов марала, приводят к повышению тонуса организма из-за активации биосинтеза в клетках скелетных мышц [3]. Было установлено, что прием продуктов пантового оленеводства вызывает активацию всех звеньев системы свёртывания крови, в т.ч. и агрегационную функцию тромбоцитов [2]. При этом в общедоступной научной литературе встречаются лишь некоторые упоминания, посвященные исследованию влияния продуктов, содержащих кровь марала, на механизмы регуляции микроциркуляторного русла.

Материалы и методы

В экспериментах было задействовано 40 белых самцов крыс Wistar массой 230 ± 30 г, выведенных в НИИ Цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Крысы до начала экспериментов содержались 2–3 недели в центральном виварии в условиях карантина. Крысы были разделены на три группы: 1 — интактная группа животных ($n=20$); 2 — контрольная группа животных ($n=10$); 3 — экспериментальная группа животных ($n=10$). Эксперимент

ставился в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте, и Директивами — 86/609/ЕЕС.

В качестве адаптогена использовался запатентованный концентрат «Пантогематоген (Лубяньгем)», (разработчик — ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт пантового оленеводства» (г. Барнаул), ТУ 9185–004–29734071–15), состоящий из цельной крови марала, гистолизата из репродуктивных органов самцов марала, сахара-песка, фруктовой эссенции, аскорбиновой кислоты и воды. При помощи коэффициента межвидового пересчета определяли режим приёма и концентрацию продукта крови марала. Установленный режим был также экспериментально уточнен и апробирован в предшествующих работах [1]. Крысы экспериментальной группы принимали водный р-р продуктов крови марала в оптимальном режиме (2 мл на 100 г массы тела в течение 30-ти дней). Контрольным животным давали водный р-р, состоящий из глюкозы, фруктовой эссенции, аскорбиновой кислоты (0,75 мл на 100 г массы тела в сутки в течение 30-ти дней). Такой состав и объем веществ определялся исходя из пропорций состава концентрата, где кровь и гистолизат были заменены водой.

Исследование микроциркуляторного русла проводилось на приборе ЛАКК-02 (НПО «Лазма», Россия), использовался метод лазерной доплеровской флоуметрии вместе с анализом амплитудно-частотного спектра колебаний кровотока в диапазоне 0,0095–0,052 Гц («активные» факторы регуляции). При проведении исследования микроциркуляции (7 мин) зонд находился в области основания хвоста крысы. Определялись: показатель микроциркуляции (ПМ) — среднее арифметическое значение показателя микроциркуляции; флакс — среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения по-

казателя амплитуды колебаний кровотока; эндотелиальные волны, характеризующие функционирование эндотелиоцитов и выработку ими оксида азота; вазомоторные волны, характеризующие активность гладкомышечных клеток [4].

Результаты исследования статистически обрабатывались с помощью программы STATISTICA 6.0 (США). Данные представлены в табл. в виде m (25–75%), где m — медиана в выборочной совокупности; (25–75%) — 25-й и 75-й перцентили. Для изучения статистической значимости использовался непараметрический метод обработки данных — U -критерий Манна—Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты исследований

Повышение флакса на 97% ($p=0,006$) отмечалось у экспериментальной группы животных, принимавших продукты крови марала в течение 30-ти дней, по сравнению с интактными животными (табл.). У крыс из экспериментальной группы также было отмечено увеличение амплитуды эндотелиальных колебаний на 71% ($p=0,007$) и повышение амплитуды вазомоторных волн на 45% ($p=0,019$). Приём глюкозы, фруктовой эссенции, аскорбиновой кислоты контрольными животными не способствовал изменению показателей лазерной доплеровской флоуметрии по сравнению с крысами интактной группы ($p > 0,05$).

Обсуждение результатов

Выявленное у животных после курсового 30-дневного приёма концентрата увеличение показателя флакса свидетельствует о повышении модуляции кровотока в микроциркуляторном русле и обусловлено более интенсивным функционированием «активных» механизмов регуляции микроциркуляции: повышение уровня эндотелиальных и вазомоторных колебаний [6].

Таблица. Показатели микроциркуляции после 30-дневного приема продуктов крови марала (экспериментальная группа), водного раствора добавок концентрата (контрольная группа), воды (интактная группа)

Table. Microcirculation indicators of rats following a 30-day course of maral blood products (experimental group), an aqueous solution of concentrate additives (control group), water (intact group)

Показатели	Группы животных		
	интактная (n=20)	контрольная (n=10)	экспериментальная (n=10)
ПМ, перфузионные единицы	7,0 (5,7–9,0)	8,3 (4,4–9,2) p=0,785	7,7 (5,9–9,5) p=0,756
Флакс, перфузионные единицы	3,8 (3,0–4,9)	3,3 (2,6–6,0) p=0,929	7,5 (5,2–9,9) p=0,006; Δ+97%
Вазомоторные волны, перфузионные единицы	11,6 (6,4–17,3)	7,7 (6,1–10,9) p=0,358	16,8 (13,1–22,1) p=0,019; Δ+45%
Эндотелиальные волны, перфузионные единицы	11,4 (7,7–19,0)	9,0 (6,1–10,6) p=0,602	19,5 (14,4–21,9) p=0,007; Δ+71%

Примечание: Δ — статистически значимая разница контрольной и экспериментальной групп с интактными животными при $p < 0,05$; n — количество животных в группе.

Note: Δ — statistically significant difference between the control and experimental groups with intact animals at $p < 0.05$; n — the number of animals in the group.

Активация пептидергической иннервации сосудистых стенок за счет действия активных цитокинов, которые были обнаружены в продуктах крови марала, выражается при флоуметрии повышением амплитуды вазомоторных волн [9]. Такое усиление модуляции вазомоторных волн микроциркуляторного русла может способствовать предотвращению констрикторного эффекта активации симпатoadреналовой системы при различном стрессорном воздействии [4]. Выявленное действие активных веществ, входящих в состав продуктов крови марала, можно расценивать как адаптивное, препятствующее развитию нарушений в микроциркуляторном русле. Увеличение показателя микроциркуляции «эндотелиальные волны» вызвано активацией синтеза и высвобождения оксида азота эндотелиоцитами. Эндотелиальный оксид азота пре-

пятствует развитию вазоконстрикторного эффекта, снижает агрегационную функцию тромбоцитов [7].

Выводы

Курсовой 30-дневный приём продукта пантового оленеводства, состоящего из крови марала и гистолизата его репродуктивных органов, в концентрации 2 мл на 100 г массы тела в сутки приводит к повышению адапционных резервов микроциркуляторного русла у крыс за счет повышения функционирования активных механизмов регуляции микроциркуляции (повышение амплитуды эндотелиальных и вазомоторных колебаний). Активными компонентами продуктов пантового оленеводства, повышающими адаптивность микроциркуляторного русла, являются кровь и гистолизат из половых органов самцов марала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Блажко А.А., Шахматов И.И., Жариков А.Ю., Киселёв В.И. Повышение антикоагулянтной и фибринолитической активности плазмы крови у крыс при использовании продуктов пантового оленеводства. *Казанский медицинский журнал*. 2018;99(1):64–70. [Blazhko A.A., Shakhmatov I.I., Zharikov A.Yu., Kiselyov V.I. Povyshenie antikoagulyantnoj i fibrinolicheskoy aktivnosti plazmy krovi u krys pri ispol'zovanii produktov pantovogo olenevodstva [Increase of anticoagulant and fibrinolytic activity of rat blood plasma when using products of velvet antler industry]. *Kazan Medical Journal*. 2018;99(1):64–70. (In Russian)].
- Бондарчук Ю.А., Блажко А.А., Алексеева О.В., Шахматов И.И., Николаев В.Ю. Влияние курсового приема элеутерококка и пантогематогена на состояние системы гемостаза. *Современные проблемы науки и образования*. 2016;6:232.

- [Bondarchuk Yu.A., Blazhko A.A., Alekseeva O.V., Shakhmatov I.I., Nikolaev V.Yu. Vliyaniye kursovogo priema eleuterokokka i pantogematogena na sostoyaniye sistemy gemostaza [The influence of eleuthero-coccus extract and antler hematogen administration on the hemostatic system]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education]. 2016;6:232. (In Russian)].
3. Жариков А.Ю., Луницын В.Г., Лампатов В.В., Мотин Ю.Г., Талалаева О.С., Елисеев Д.В., Павляшик Г.В. Влияние новых средств из сырья пантовых оленей на биосинтетические процессы в клетках скелетной мускулатуры крыс в условиях длительной физической нагрузки. *Биомедицина*. 2016;1:90–94. [Zharikov A.Yu., Lunicyn V.G., Lampatov V.V., Motin Yu.G., Talalaeva O.S., Eliseev D.V., Pavlyashik G.V. Vliyaniye novykh sredstv iz syr'ya pantovykh oleney na biosinteticheskiye processy v kletkakh skeletnoy muskulatury krysv v usloviyah dlitel'noy fizicheskoy nagruzki [Influence of new agents from raw materials of fawn's antlers on biosynthetic processes in rats skeletal muscles cells in conditions of long physical activity]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2016;1:90–94. (In Russian)].
 4. Крупаткин А.И. Колебания кровотока — новый диагностический язык в исследовании микроциркуляции. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2014;13(1):83–99. [Krupatkin A.I. Kolebaniya krovotoka — novyj diagnosticheskij yazyk v issledovanii mikroциркуляcii [Blood flow oscillations — new diagnostic language in microvascular research]. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikroциркуляciya* [Regional blood circulation and microcirculation]. 2014;13(1):83–99. (In Russian)].
 5. Муравьев А.В., Ахапкина А.А., Михайлов П.В., Муравьев А.А. Микроциркуляция в коже при мышечной нагрузке как модель для изучения общих механизмов изменения микрокровоотока. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2014;2(50):64–68. [Murav'ev A.V., Ahapkina A.A., Mihajlov P.V., Murav'ev A.A. Mikroциркуляciya v kozhe pri myshechnoj nagruzke kak model' dlya izucheniya obshchih mekhanizmov izmeneniya mikrokrivotoka [Skin microcirculation under muscular exercise as a model for the study of the mechanisms of microcirculatory alterations]. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikroциркуляciya* [Regional blood circulation and microcirculation]. 2014;2(50):64–68. (In Russian)].
 6. Kvandal P., Stefanovska A., Veber M., Kvernmo H.D., Kirkeboen K.A. Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandins. *Microvascular research*. 2003;65(3):160–171.
 7. Meyer M.F., Rose C.J., Hülsmann J.O., Schatz H., Pfohl M. Impaired 0.1-Hz vasomotion assessed by laser Doppler anemometry as an early index of peripheral sympathetic neuropathy in diabetes. *Microvascular Research*. 2003;65(2):88–95.
 8. Wu F., Li H., Jin L., Li X., Ma Y., You J., Li S., Xu Y. Deer antler base as a traditional Chinese medicine: a review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. *J. of Ethnopharmacology*. 2013;145(2):403–415.
 9. Zhao L., Mi Y., Guan H., Xu Y., Mei Y. Velvet antler peptide prevents pressure overload-induced cardiac fibrosis via transforming growth factor (TGF)- β 1 pathway inhibition. *Eur. J. of Pharmacology*. 2016;15(783):33–46.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Блажко Александр Александрович*, к.м.н., ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: Blazhko_1990@mail.ru

Шахматов Игорь Ильич, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: iish59@yandex.ru

Вдовин Вячеслав Михайлович, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: erytrab@gmail.com

Alexander A. Blazhko*, Cand. Sci. (Med.), Altai State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: Blazhko_1990@mail.ru

Igor I. Shakhmatov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Altai State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: iish59@yandex.ru

Vyacheslav M. Vdovin, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Altai State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: erytrab@gmail.com

Бондарчук Юлия Алексеевна, к.м.н., доц.,
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: bondarchuk2606@yandex.ru

Лычева Наталья Александровна, к.б.н.,
ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН;
e-mail: kuzminan_86@mail.ru

Москаленко Светлана Валерьевна, ФГБОУ
ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: sunriseismv@gmail.com

Манаева Ирина Николаевна, ФГБОУ ВО
«Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: krinitsina.irina@mail.ru

Yulia A. Bondarchuk, Cand. Sci. (Med.), Assoc.
Prof., Altai State Medical University of the Ministry
of Health Care of Russia;
e-mail: bondarchuk2606@yandex.ru

Natalia A. Lycheva, Cand. Sci. (Biol.), Sechenov
Institute of Evolutionary Physiology and
Biochemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: kuzminan_86@mail.ru

Svetlana V. Moskalenko, Altai State Medical
University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: sunriseismv@gmail.com

Irina N. Manaeva, Altai State Medical University
of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: krinitsina.irina@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Н.Ю. Тимофеева*, Н.В. Бубнова, Г.Ю. Стручко, О.Ю. Кострова, И.С. Стоменская

*ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»
428015, Российская Федерация, Чебоксары, Московский просп., 15*

Одной из основных проблем современной медицины являются онкологические заболевания, которые занимают второе место среди причин смерти после сердечно-сосудистой патологии. Злокачественные новообразования известны давно, но их изучение представляет большую сложность. Моделирование злокачественных процессов на животных позволяет исследовать опухоли и выявить основные закономерности злокачественного роста, характерные для животных и человека. Основной причиной смерти при злокачественных новообразованиях является процесс образования метастазов, который до сегодняшнего дня полностью не изучен. Исследование процессов метастазирования — одна из важнейших задач онкологии, для изучения которой создаются различные модели метастазирования опухолей. В статье представлены литературные данные по наиболее используемым в экспериментальных условиях моделям метастазирования, проводится их сравнительная характеристика. Произведена оценка преимуществ и недостатков основных способов моделирования метастазирования.

Ключевые слова: злокачественные новообразования, модели метастазирования, эксперимент

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Тимофеева Н.Ю., Бубнова Н.В., Стручко Г.Ю., Кострова О.Ю., Стоменская И.С. Методы экспериментального моделирования метастазирования. *Биомедицина*. 2021;17(4):44–49. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-44-49>

Поступила 01.12.2020

Принята после доработки 18.03.2021

Опубликована 10.12.2021

METHODS OF EXPERIMENTAL MODELING OF METASTASIS

Natalia Yu. Timofeeva*, Natalia V. Bubnova, Gleb Yu. Struchko, Olga Yu. Kostrova,
Irina S. Stomenskaya

*I.N. Ulyanov Chuvash State University
428015, Russian Federation, Cheboksary, Moskovskiy Avenue, 15*

One of the main problems of modern medicine is cancer, which is the second leading cause of death after cardiovascular disease. Malignant neoplasms have been known for a long time; however, their study still presents significant difficulties. Modeling of malignant processes in animals allow researchers to study tumors and the main patterns of malignant growth characteristic of animals and humans. The main cause of death in malignant neoplasms is the process of metastasis formation, which remains to be understood in detail. The study of metastatic processes is one of the most important tasks of oncology. To this end, various models of tumor metastasis are created. The article reviews literature data on the most popular models of metastasis in experimental conditions. The advantages and disadvantages of the main approaches to modeling metastasis are evaluated.

Keywords: malignant neoplasms, metastasis models, experiment

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

For citation: Timofeeva N.Yu., Bubnova N.V., Struchko G.Yu., Kostrova O.Yu., Stomenskaya I.S. Methods of Experimental Modeling of Metastasis. *Journal Biomed.* 2021;17(4):44–49. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-44-49>

Submitted 01.12.2020

Revised 18.03.2021

Published 10.12.2021

Введение

Злокачественная патология в настоящее время занимает одно из ведущих мест в структуре смертности населения. Основной причиной летального исхода при развитии онкологического заболевания является метастазирование — процесс расселения опухолевых клеток по всему организму. Метастазирование — это наиболее разрушительный аспект опухолевого процесса и главная причина неэффективности лечения [7]. Именно поэтому развитие злокачественных новообразований и процессы метастазирования являются одной из интенсивно изучаемых проблем в науке.

Несмотря на значительные достижения в области диагностики и лечения рака, метастатические процессы изучены не полностью. Не раскрыт сам механизм появления метастазов. Отсутствие достоверных знаний о патогенезе расселения опухолевых клеток лишает возможности их ранней диагностики. Изучение процессов метастазирования на пациентах ограничено в силу ряда причин. В основном это связано с тем, что пациенты чаще всего обращаются за медицинской помощью в запущенном состоянии вследствие бессимптомного течения начала метастатического процесса. Проведение общеклинического и биохимического анализов крови возможно на любой стадии развития злокачественной опухоли, но, к сожалению, чаще всего их результаты носят малоинформативный и неспецифический характер. Изучение метастазов, удаленных во время операции, позволяет получить представление только о соотношении определенных биологически активных

веществ в них в момент забора материала, и при этом не позволяет проследить динамику процесса роста, сравнить полученные результаты со здоровой тканью. Для того чтобы ответить на вопросы, возникающие у практикующих врачей и ученых, необходимо проведение экспериментальных исследований. Экспериментальные исследования — это единственный инструмент, позволяющий ответить на интересующие вопросы. Развитие науки невозможно без постановки экспериментов, проведение которых на человеке недопустимо.

Моделирование метастазирования

Пригодность моделей опухолевого роста и метастазирования *in vivo* зависит от того, насколько точно они имитируют человеческие заболевания.

В настоящее время используют два основных способа моделирования метастазирования. Первый из них — экспериментальный, или искусственный, включает в себя модели, в которых опухолевые клетки вводятся непосредственно в орган или вены [10, 14, 17, 21]. При внутрисосудистом введении опухолевые клетки проникают в капиллярное русло и создают сайты экспериментальных метастазов в том органе, в региональный сосуд которого они попали, например печень, легкие [2, 14]. Так, при введении клеток в хвостовую вену грызунов метастазы формируются в легких, при инъекции клеток в левый желудочек сердца метастазы главным образом формируются в печени, реже в костном и головном мозге [7]. Их главный недостаток состоит в том, что опухолевый процесс

при этом нельзя считать метастазом, т.к. отсутствует первичный очаг.

В других случаях опухоль помещается непосредственно в орган [21], т.е. производится ортотопическая пересадка, которая приводит к локализованному и быстрому росту опухоли, а в некоторых моделях — к развитию отдаленных метастазов [7]. Ортотопическая имплантация опухоли является предпочтительной для более тщательного анализа роста опухоли и ее метастазирования. Несмотря на хорошее соответствие ортотопической модели опухоли клинической картине, ее использование затруднено из-за технологических сложностей, длительности и дороговизны проведения экспериментов [8].

Существует модель метастазирования с введением раковых клеток различных тканей в селезенку крыс и мышей под общим наркозом [1, 13, 18, 22]. Опухоли в данном случае чаще метастазируют в печень. Из минусов необходимо указать на использование животных Nude с нарушенной иммунной системой, потерю гистологического сходства злокачественных клеток человека, пересаженных этим животным, с основной опухолью при повторном применении, сочетанное (гематогенно-лимфогенное) метастазирование привитых опухолей и отсутствие возможности безаппаратного контроля роста первичного очага опухоли в селезенке.

Наиболее часто используется подкожное или внутримышечное введение взвеси опухолевых клеток [3, 7]. Не теряет своего значения метод инъекции опухолевых клеток в брюшную полость животных с последующим получением т.н. асцитных опухолей в виде суспензии размножающихся клеток в накапливающейся перитонеальной жидкости [7].

Второй способ моделирования метастазирования называется спонтанным. При этом метастазы образуются из первичных солидных опухолей, которые могут быть полу-

чены несколькими путями. Данная группа включает модели, использующие канцерогены [4, 5]. К наиболее часто применяемым канцерогенам относятся диметилгидразин и его метаболиты азоксиметан, N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин и N-метил-N-нитрозомочевина [15]. Возможно применение ультрафиолетового излучения [16] и онкогенных вирусов [19]. В результате воздействия канцерогенов образуются т.н. автохтонные опухоли [7]. Считается, что такие опухоли могут точнее имитировать человеческие по сравнению с трансплантируемыми (например, подкожными или ортотопическими). Достоинствами автохтонных моделей являются ортотопический рост опухоли, правильная ее гистоморфология без внесения изменений, характерных для перевиваемой опухоли, а также метастазирование через лимфатические и кровеносные сосуды, окружающие и пронизывающие первичную опухоль [12]. Успехи эксперимента, в частности развитие злокачественного роста и образование метастазов при этом, напрямую зависят от используемого канцерогена, его дозировки, длительности, способа и частоты введения, а также от особенностей животного, которому его вводят. Резекция первичной опухоли в данном методе увеличивает скорость роста метастазов. При проведении данных экспериментов могут быть учтены множество параметров, включая количество метастазов, сайты метастазирования, скорость роста опухоли, наличие и гистопатологию спонтанных метастазов и их иммуногистохимию [7]. К главным недостаткам данного метода относятся низкая скорость метастазирования, токсическое воздействие канцерогена на организм и длительность эксперимента.

Чаще всего в качестве объектов исследования для моделирования метастатического поражения используют мышей или крыс с сохраненным или ослабленным иммунитетом. Для этого экспериментальным животным пересаживают опухолевые

штаммы данного вида или вводят канцерогены. Перевивка человеческих опухолей возможна иммунодефицитным животным (Nude) и животным с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) [6, 7]. Отличием Nude крыс и мышей является отсутствие тимуса, вследствие чего в их организме не происходит процессов образования Т-лимфоцитов. У мышей SCID есть мутация в рецепторе цитокинов (интерлейкин-2), которая приводит к нарушению процессов созревания лимфоцитов и дефициту циркулирующих зрелых Т- и В-клеток [7]. Для снижения активности естественного иммунитета используют мышей с мутацией *beige*, в результате которой NK-клетки (естественные киллеры) мышей лишены вторичных гранул и имеют значительно ослабленную активность [23]. Также используют NOD-SCID-мышей, которых можно гуманизировать введением клеток периферической крови человека или клеток костного мозга, что создает более адекватную систему микроокружения для опухолевых клеток [11]. Вследствие этого иммунодефицитным животным возможна перевивка широкого спектра типов опухолей и проведение генетических или терапевтических манипуляций *ex vivo* перед ксенотрансплантацией. Но есть ряд недостатков таких моделей: кровоснабжение и строма опухоли обеспечиваются мышью, ортотопическая трансплантация технически затруднена, а метастазирование новообразования происходит очень редко. Кроме того, если источником ксенотрансплантатов являются постоянные непрерывно перевиваемые (>100 раз) клеточные линии, то они становятся недифференцированными и теряют свое гистологическое сходство с реальной опухолью [20]. Кроме того, стоимость мутантных животных достаточно высока, что значительно снижает их доступность.

Существуют модели экспериментального метастазирования на куриных эмбрионах [24]. Куриный эмбрион является уникальной моделью, позволяющей обойти многие ограничения при изучении канцерогенеза *in vivo* [24]. Доступностью хориоаллантаической мембраны, хорошо васкуляризированной экстраэмбриональной ткани, расположенной под скорлупой и толерантной к ксенотрансплантатам опухолевых клеток, объясняется удобство применения объекта для проведения экспериментальных исследований для изучения молекулярных механизмов опухолевого роста, включая метаплазию, вирусный канцерогенез, реакции на ксенотрансплантацию опухолевых клеток, ангиогенез и метастазирование [24]. Ввиду иммунодефицитности куриного эмбриона на хориоаллантаической мембране хорошо приживаются как нормальные, так и опухолевые клетки [24]. Важно то, что на хориоаллантаической мембране опухолевые клетки сохраняют основные свойства, в т.ч. способность к росту, инвазии, ангиогенезу и перестройке соседних структур. В связи с этим данный объект является исключительно удобной моделью для изучения молекулярных механизмов опухолевого роста [9, 24].

Заключение

Таким образом, высокая частота метастазирования рака и низкая эффективность традиционных методов терапии требуют более глубокого изучения данного процесса. В решении данных вопросов нам помогают экспериментальные методы исследования. Выбор и создание модели опухоли для изучения процессов канцерогенеза и метастазирования является очень сложной задачей. Необходимо четко понимать преимущества и недостатки каждой из имеющихся моделей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Евстратова О.Ф. Способ получения метастазов печени в эксперименте. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014;6:745–747. [Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Evstratova O.F. Sposob polucheniya metastazov pecheni v eksperimente [Method for obtaining liver metastases in an experiment]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014;6:745–747. (In Russian)].
2. Козлова М.Б., Франциянц Е.М., Трепитаки Л.К., Каплиева И.В., Погорелова Ю.А., Сергостьянц Г.З., Айрапетова Т.Г., Чубарян А.В. Роль пола в характере системных и тканевых нарушений гормонального гомеостаза у крыс с экспериментальной моделью метастазирования в легкие. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2016;3:377–380. [Kozlova M.B., Frantsiyants E.M., Trepitaki L.K., Kaplieva I.V., Pogorelova Yu.A., Sergost'yan G.Z., Airapetova T.G., Chubaryan A.V. Rol' pola v kharaktere sistemnykh i tkanevykh narushenii gormonal'nogo gomeostaza u kryс s eksperimental'noi model'yu metastazirovaniya v legkie [The role of gender in the nature of systemic and tissue disorders of hormonal homeostasis in rats with an experimental model of lung metastasis]. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza [Medical Bulletin of the North Caucasus]*. 2016;3:377–380. (In Russian)].
3. Лацерус Л.А., Пинигина Н.М., Козлов А.М., Барышников А.Ю. Влияние препарата Абисилин на процесс искусственного рецидивирования и метастазирования карциномы легкого Льюис мышей. *Российский биотерапевтический журнал*. 2010;1:29–33. [Latserus L.A., Pinigina N.M., Kozlov A.M., Baryshnikov A.Yu. Vliyanie preparata Abisilin na protsess iskusstvennogo retsidivirovaniya i metastazirovaniya kartsinomy legkogo L'yuis myshei [The influence of the drug Abisilin the process of artificial recurrence and metastasis of lung carcinoma Lewis mice]. *Russian Biotherapeutic Journal*. 2010;1:29–33. (In Russian)].
4. Москвичев Е.В., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Кострова О.Ю. Морфология рака толстой кишки после применения 1,2-диметилгидрозолин дегидрохлорида. *Вестник новых медицинских технологий*. 2009;S2:121–122. [Moskvichev E.V., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Kostrova O.Yu. Morfologiya raka tolstoy kishki posle primeneniya 1,2-dimetilgidrozolin degidrokhlorida [Morphology of colon cancer after the use of 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii [Bulletin of New Medical Technologies]*. 2009;S2:121–122. (In Russian)].
5. Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Москвичев Е.В., Михайлова М.Н., Кострова О.Ю., Стоменская И.С. Морфофункциональное состояние тимуса в условиях развития опухоли толстой кишки. *Здравоохранение Чувашии*. 2009;3:47–52. [Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Moskvichev E.V., Mikhailova M.N., Kostrova O.Yu., Stomenskaya I.S. Morfofunktsional'noe sostoyanie timusa v usloviyakh razvitiya opukholi tolstoy kishki [Morphofunctional state of the thymus in the conditions of colon tumor development]. *Zdravookhranenie Chuvashii [Chuvashia Healthcare Journal]*. 2009;3:47–52. (In Russian)].
6. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований. *Российский биотерапевтический журнал*. 2017;3:6–13. [Treshchalina E.M. Immunodefitsitnyye mysli Balb/c nude i modelirovanie razlichnykh variantov opukholevogo rosta dlya doklinicheskikh issledovaniy [Immunodeficient BALB/c nude mice and modeling of various tumor growth variants for preclinical studies]. *Russian Biotherapeutic Journal*. 2017;3:6–13. (In Russian)].
7. Холоденко И.В., Доронин И.И., Холоденко Р.В. Опухолевые модели в изучении онкологических заболеваний. *Иммунология*. 2013;5:282–286. [Kholodenko I.V., Doronin I.I., Kholodenko R.V. Opukholevye modeli v izuchenii onkologicheskikh zabolevaniy [Tumor models in the study of oncological diseases]. *Immunology*. 2013;5:282–286. (In Russian)].
8. Bibby M.C. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur. J. Cancer*. 2004;40(6):852–857. DOI: 10.1016/j.ejca.2003.11.021.
9. Bobek V., Plachy J., Pinterova D., Kolostova K., Boubelik M., Jiang P., Yang M., Hoffman R.M. Development of a green fluorescent protein metastatic-cancer chick-embryo drugscreen model. *Clin. Exp. Metastasis*. 2004;21(4):347–352. DOI: 10.1023/b:clin.0000046138.58210.31.
10. Bocuc D., Wolff A., Krause P., et al. The adaptation of colorectal cancer cells when forming metastases in the liver: expression of associated genes and pathways in a mouse model. *BMC Cancer*. 2017;17(1):342. DOI: 10.1186/s12885-017-3342-1.
11. Cespedes V.M., Casanova I., Parreno M., Mangues R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin. Transl. Oncol*. 2006;8(5):318–329.
12. Fiebig H.H., Burger B.A. Relevance of tumor models for anticancer drug development. *Contributions to oncology*. Basel: Karger. 1999;15–27.
13. Fleten K.G., Bakke K.M., Maelandsmo G.M., et al. Use of non-invasive imaging to monitor response to aflibercept treatment in murine models of colorectal cancer liver metastases. *Clin. Exp. Metastasis*. 2017;34(1):51–62. DOI: 10.1007/s10585-016-9829-3.
14. Hatwell C., Zappa M., Wagner M., et al. Detection of liver micrometastases from colorectal origin by perfusion CT in a rat model. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int*. 2014;13(3):301–308. DOI: 10.1016/s1499-3872(14)60043-6.

15. Heijstek M.W., Kranenburg O., Borel Rinkes I.H. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig. Surg.* 2005;22(1–2):16–25. DOI: 10.1159/000085342.
16. Mason R.S., Reichrath J. Sunlight vitamin D and skin cancer. *Anticancer Agents. Med. Chem.* 2013;13(1):83–97.
17. Muraoka T., Shirouzu K., Ozasa H., et al. The effect of starvation on blood stream cancer cell metastasis to the liver in rat after laparotomy. *Kurume Med. J.* 2013;60(2):59–66. DOI: 10.2739/kurumemedj.ms63005.
18. Nakamura M., Suemizu H. Novel metastasis models of human cancer in NOG mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008;324:167–177. DOI: 10.1007/978-3-540-75647-7_11.
19. Ross S.R. Mouse mammary tumor virus molecular biology and oncogenesis. *Viruses.* 2010;2(9):2000–2012. DOI: 10.3390/v2092000.
20. Sausville E.A., Burger A.M. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res.* 2006;66(7):3351–3354, discussion 3354. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3627.
21. Strowitzki M.J., Dold S., von Heesen M., et al. The phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol does not stimulate growth of colorectal liver metastases after major hepatectomy. *Clin. Exp. Metastasis.* 2014;31:795–803.
22. Suemizu H., Monnai M., Ohnishi Y., Ito M., et al. Identification of a key molecular regulator of liver metastasis in human pancreatic carcinoma using a novel quantitative model of metastasis in NOD/SCID/gammacnull (NOG) mice. *Int. J. Oncol.* 2007;31(4):741–751.
23. Talmadge J.E., Meyers K.M., Prieur D.J., Starkey J.R. Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. *Nature.* 1980;284(5757):622–624. DOI: 10.1038/284622a0.
24. Zijlstra A., Mellor R., Panzarella G. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 2002;62(23):7083–7092.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тимофеева Наталья Юрьевна*, ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»;
e-mail: bla11blabla@yandex.ru

Бубнова Наталья Владимировна, ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»;
e-mail: natalia210485@yandex.ru

Стручко Глеб Юрьевич, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»;
e-mail: glebstr@mail.ru

Кострова Ольга Юрьевна, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»;
e-mail: evkbiz@yandex.ru

Стоменская Ирина Станиславовна, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»;
e-mail: irina.stomenskaja@gmail.com

Natalia Yu. Timofeeva*, I.N. Ulyanov Chuvash State University;
e-mail: bla11blabla@yandex.ru

Natalia V. Bubnova, I.N. Ulyanov Chuvash State University;
E-mail: natalia210485@yandex.ru

Gleb Yu. Struchko, Dr. Sci. (Med.), Prof., I.N. Ulyanov Chuvash State University;
e-mail: glebstr@mail.ru

Olga Yu. Kostrova, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., I.N. Ulyanov Chuvash State University;
e-mail: evkbiz@yandex.ru

Irina S. Stomenskaya, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., I.N. Ulyanov Chuvash State University;
e-mail: irina.stomenskaja@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



РАНОЗАЖИВЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА *PRUNELLA GRANDIFLORA* L.

Е.В. Болотник^{1,*}, Л.И. Алексеева¹, Л.П. Ларионов²

¹ ФГБУН «Ботанический сад» Уральского отделения РАН,
620144, Российская Федерация, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202-а

² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,
620028, Российская Федерация, Екатеринбург, ул. Репина, 3

Изучен качественный состав фенольных кислот и ранозаживляющая активность экстракта *Prunella grandiflora* L. С помощью ВЭЖХ в сухом экстракте *P. grandiflora* определили содержание розмариновой (621 ± 5 мг/г), кофейной ($11,2 \pm 0,2$ мг/г), сиреневой ($46,5 \pm 1,4$ мг/г), п-кумаровой ($25,8 \pm 0,5$ мг/г), феруловой ($42,7 \pm 2,9$ мг/г) кислоты. На основе данного экстракта были разработаны три различных по составу противоожоговых средства с 5% сухим экстрактом *Prunella grandiflora* L. и апробированы на модели термического ожога II–IIIа степени у крыс самцов популяции линий Wistar. Проведена оценка восстановления кожных покровов в опытных группах животных и в контроле. Выявлено, что восстановление эпителия и покрытие шерстью в группах крыс, леченных экспериментальными мягкими лекарственными формами, происходит раньше, чем в группах, леченных основами без экстракта на 6–8 дней. Установлено, что приготовленные мягкие лекарственные формы на основе экстракта *P. grandiflora* обладают противовоспалительным и ранозаживляющим действием.

Ключевые слова: ожоги, противоожоговая активность, *Prunella grandiflora* L., черноголовка крупноцветковая, розмариновая кислота

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Болотник Е.В., Алексеева Л.И., Ларионов Л.П. Ранозаживляющая активность экстракта *Prunella grandiflora* L. *Биомедицина*. 2021;17(4):50–56. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-50-56>

Поступила 17.02.2021

Принята после доработки 01.04.2021

Опубликована 10.12.2021

BURN WOUND HEALING ACTIVITY OF *PRUNELLA GRANDIFLORA* L. EXTRACT

Elizaveta V. Bolotnik^{1,*}, Lyudmila I. Alekseeva¹, Leonid P. Larionov²

¹ Botanical Garden of the Ural Branch of RAS
620144, Russian Federation, Ekaterinburg, 8 Marta Str., 202-a

² Ural State Medical University
620028, Russian Federation, Ekaterinburg, Repina Str., 3

The qualitative composition of phenolic acids and burn wound healing activity of *Prunella grandiflora* L. extract were studied. The content of rosmarinic (621 ± 5 mg/g), coffeic (11.2 ± 0.2 mg/g), syringic (46.5 ± 1.4 mg/g), n-coumaric (25.8 ± 0.5 mg/g), and ferulic (42.7 ± 2.9 mg/g) acids in dry extracts of *P. grandiflora* was determined by HPLC. Three new burn-healing agents of different composition containing 5% of the dry extract of *Prunella grandiflora* L. (big-flowered self-heal) were developed. The developed agents were tested on male Wistar rats with second- and third-degree thermal burns. An assessment of skin restoration

was carried out in experimental and control groups of animals. It was revealed that animals treated with the developed soft dosage forms restored the epithelium and coat 6–8 days faster than those treated with compositions containing no extract under study. It was found that the developed soft dosage forms based on *P. grandiflora* extract exhibit anti-inflammatory and wound-healing action.

Keywords: burns, burn-healing activity, *Prunella grandiflora* L., big-flowered self-heal, rosmarinic acid

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

For citation: Bolotnik E.V., Alekseeva L.I., Larionov L.P. Burn Wound Healing Activity of *Prunella Grandiflora* L. Extract. *Journal Biomed.* 2021;17(4):50–56. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-50-56>

Submitted 17.02.2021

Revised 01.04.2021

Published 10.12.2021

Введение

В настоящее время используется множество современных лекарственных средств (ЛС) для лечения больных с термическими ожогами, ряд из которых содержат биологически активные вещества (БАВ) растительного происхождения [1, 7, 8]. Современные исследования показывают, что синтетические лекарственные препараты при местном применении нередко сравнимы с препаратами растительного происхождения, содержащими БАВ, в лечении ожогов и сроках полного излечения. Кроме того, препараты растительного происхождения при длительном применении в меньшей степени вызывают сенсibilизацию и аллергические реакции организма, которые легко обратимы [9, 10]. Поэтому расширение арсенала лекарственных средств для лечения больных с поверхностными термическими ожогами на основе лекарственного растительного сырья является актуальным.

В этом аспекте значительный интерес представляют известные в народной медицине виды рода *Prunella* *Prunella vulgaris* L. и *Prunella grandiflora* L. Водные извлечения из надземной части *Prunella vulgaris* L. широко используются как ранозаживляющее, противовоспалительное, антимикробное, жаропонижающее, отхаркивающее, тонизирующее и антикомплемментарное средство [11, 13].

Ранее нами показано, что содержание розмариновой кислоты в растениях черноголовки крупноцветковой *P. grandiflora* выше, чем в черноголовке обыкновенной *P. vulgaris* [2]. Как известно, розмариновая кислота оказывает значительное ранозаживляющее действие; при этом активизация процессов регенерации происходит за счет более активного появления клеточных элементов в зоне рубцующейся ткани и заполнения дефекта коллагеновыми волокнами [13]. Розмариновая кислота обладает противовоспалительной [12], антиаллергенной, антивирусной активностью [3].

Целью настоящего исследования является разработка нетоксичных мягких лекарственных форм, содержащих экстракт травы *P. grandiflora* (черноголовка крупноцветковая), и апробация ранозаживляющего эффекта при термическом ожоге у экспериментальных животных.

Материалы и методы

Отбор проб растительного сырья проводили в природных популяциях *P. grandiflora* на Среднем Урале. Траву *P. grandiflora* собирали в фазу цветения в Красноуфимском районе Свердловской области к северу от д. Марийский Усть-Маш г. Мокрая (N 56°09'22.0", E 058°32'19.6") в период с 15 по 20 июля.

Сушку растений осуществляли воздушно-теневым способом. Высушенное сырьё измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 2 мм. Перед приготовлением лекарственных форм надземную часть растений *P. grandiflora* экстрагировали 96 % этанолом в течение 24 ч при комнатной температуре. Экстракт фильтровали через бумажный фильтр и высушивали на роторном испарителе. Сухой экстракт *P. grandiflora* добавляли в заранее подготовленные составы: вазелин-ланолиновую смесь, карбопол и гидрокрем и получили три экспериментальных лекарственных формы К-1, К-2 и К-3, соответственно. В качестве контроля использовали мягкие лекарственные формы (К-4), (К-5) и нелеченую группу животных (К). Состав и процентное соотношение компонентов исследованных мягких лекарственных форм представлены в табл.

Содержание фенолкарбоновых кислот сухого экстракта *P. grandiflora* определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализ проб проводили в трёх повторностях. На этапе пробподготовки экстракта брали навеску 100 мг травы черноголовки крупноцветковой и растворяли в 10 мл 96%-го этанола. ВЭЖХ проводили на оборудовании «Кнауер»: насос Smartline 1000, детектор UV-VIS Smartline 2500 с использовани-

ем колонки Kromasil 100–5 C18 250x4 мм («Eka Nobel», Швеция). Использовали растворители марки «чда» производства ОАО «Реактив», Россия. Для определения фенолкарбоновых кислот, в т.ч. розмариновой кислоты, использовали элюент вода — ацетонитрил — фосфорная кислота (85:15:0.05) при скорости элюирования 0,7 мл/мин, длине волны 250 нм. Вещества идентифицировали, сравнивая t_R (время удерживания) с t_R стандартных образцов («Sigma-Aldrich», Германия). В качестве стандартных образцов использовали розмариновую кислоту ($\geq 98\%$, CAS 20283–92–5), п-кумаровую кислоту ($\geq 98\%$, CAS 501–98–4), феруловую кислоту ($\geq 98\%$, CAS 537–98–4), кофейную кислоту ($\geq 98\%$, CAS 331–39–5), сиреневую кислоту ($\geq 95\%$, CAS 530–57–5). Количество кислот рассчитывали методом абсолютной градуировки.

Экспериментальные животные содержались при температуре 20–22°C в условиях естественного и искусственного освещения на стандартном рационе питания при свободном доступе к воде и корму [9]. Доклинические исследования по ранозаживляющему действию изучаемых экспериментальных мягких лекарственных форм при термическом ожоге проводили на 60-ти белых крысах самцах популяции линий Wistar массой 195±5 г возрастом 5 мес. Экспериментальные животные были

Таблица. Состав мягких лекарственных форм
Table. Composition of soft dosage forms

Название	Наименование компонентов и их содержание, %
К-1	вазелин — 85; ланолин — 7; сухой экстракт <i>P. grandiflora</i> — 5; вода — до 100%
К-2	карбопол — 1,50; метилпарабен — 0,25; пропилпарабен — 0,25; 10% р-р натрия гидроксида — 2; сухой экстракт <i>P. grandiflora</i> — 5, вода — до 100%
К-3	карбопол — 0,25; глицерин — 2; триэтаноламин — 0,3; воск эмульсионный — 3; кукурузное масло — 1; глицерилстеарат — 3; масло минеральное — 5; триглицериды каприловой и каприновой кислот — 3; циклометикон — 2; масло какао — 3; сухой экстракт <i>P. grandiflora</i> — 5; вода — до 100%
К-4	карбопол — 1,50; метилпарабен — 0,25; пропилпарабен — 0,25; 10% р-р натрия гидроксида — 2; вода — до 100%
К-5	карбопол — 0,25; глицерин — 2; триэтаноламин — 0,3; воск эмульсионный — 3; кукурузное масло — 1; глицерилстеарат — 3; масло минеральное — 5; триглицериды каприловой и каприновой кислот — 3; циклометикон — 2; масло какао — 3; вода — до 100%

распределены на шесть групп по десять особей в каждой. Модель термического ожога крысам, находящимся под эфирным наркозом, создавали металлическим шпателем (площадью 6х2 см, т.е. 12 см²), разогретым до температуры 98–100°C. Время контакта шпателя с выстриженным от шерсти участком кожи животного — 40 с [4]. Данный ожог соответствует II–IIIa степени тяжести. Через сутки после ожога крысам опытных групп наносили на пораженные участки кожи К-1, К-2 и К-3 и контроль К-4 и К-5. Контрольная группа (К) лечения не получала. Эти исследуемые мягкие лекарственные формы наносили на ожоговую поверхность ежедневно (в утренние часы) в течение 21-го дня в дозе 200 мг (512,82 мг/кг), равномерно распределяя их стеклянной палочкой по всей ожоговой поверхности. Эта доза была определена в соответствии её безвредности для экспериментального животного при длительном применении. Согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [9], если вещество не вызывает токсического проявления на лабораторном животном в дозе более 2000 мг/кг, то оно считается безопасным. В скрининговых исследованиях на мышах нам не удалось определить LD₅₀ изучаемого экстракта при местном нанесении, поэтому из трёх рекомендуемых доз (1/100, 1/50 и 1/10 от максимальной дозы — 2000 мг/кг) мы избрали максимальную дозу 512,82 мг/кг в мягкой лекарственной форме, т.е. 200 мг на особь массой 195±5,0 г [6].

Статистическую обработку проводили с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel и Statistica 6.0. При сравнении и анализе выборок использовали непараметрический критерий с достоверностью $p < 0,05$ (U-критерий Манна–Уитни), методы описательной статистики в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки.

Результаты и их обсуждение

Приготовленный сухой концентрированный экстракт *P. grandiflora* представляет собой порошок темного зеленоватого цвета без запаха. В сухом экстракте *P. grandiflora* содержится розмариновая (621±5,0 мг/г), кофейная (11,2±0,2 мг/г), сиреневая (46,5±1,4 мг/г), п-кумаровая (25,8±0,5 мг/г), феруловая (42,7±2,9 мг/г) кислоты (рис. 1).

В экспериментальных лекарственных формах К-1, К-2 и К-3 содержание розмариновой кислоты снизилось и составило 155±5,0 мг в каждой лекарственной форме. На основании представленных составов мягких лекарственных форм, содержащих БАВ, предположили их возможное ранозаживляющее действие при термических ожогах.

Исследуя фармакологическое ранозаживляющее действие трех экспериментальных мягких лекарственных форм с экстрактом *P. grandiflora* и основ карбопола, гидрокрема, проводили сравнительную оценку заживления ожоговых ран у экспериментальных животных (рис. 2).

Отмечали скорость прохождения этапов эпителизации ожоговых ран: образование корочки, нарушение целостности корочки, отторжение корочки, восстановление эпителия и покрытие шерстью. Корочка у всех групп сформировалась на 3–4 сут. после получения термического ожога. Восстановление эпителия и покрытие шерстью в группах крыс, леченных К-1–К-3, происходит раньше, чем в группах, леченных основами без экстракта, на 6–8 дней (рис. 2). Стандартная ошибка среднего не превышает 9%. По критерию Манна–Уитни были получены значимые различия ($p < 0,05$) у опытных групп, получавших лечение мягкими лекарственными формами К-1–К-5, в сравнении с контролем (К) на стадии нарушения целостности корочки и отторжения корочки. По времени наступления стадий образование корочки, восстановление эпителия и покрытие шерстью

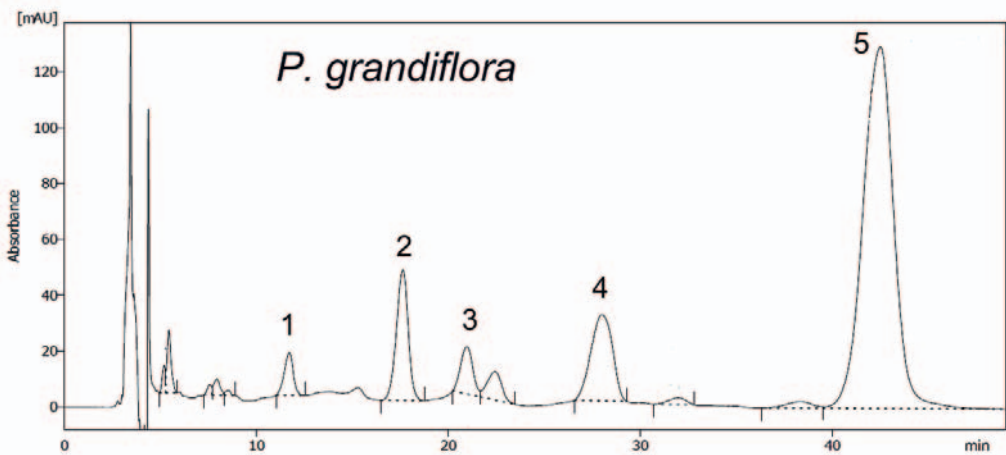


Рис. 1. Хроматограмма сухого экстракта надземной части *P. grandiflora*.

По оси абсцисс — время удерживания, tR , мин; по оси ординат — оптическая плотность, е. о.п.; 1 — кофейная, 2 — сиреневая, 3 — *p*-кумаровая, 4 — феруловая, 5 — розмариновая кислоты.

Fig. 1. Chromatogram of dry extract of the aerial part of *P. grandiflora*.

The abscissa axis shows the retention time, tR , min; ordinate axis — optical density, o. d. u.; 1 — coffeic, 2 — syringic, 3 — *p*-coumaric, 4 — ferulic, 5 — rosmarinic acids.

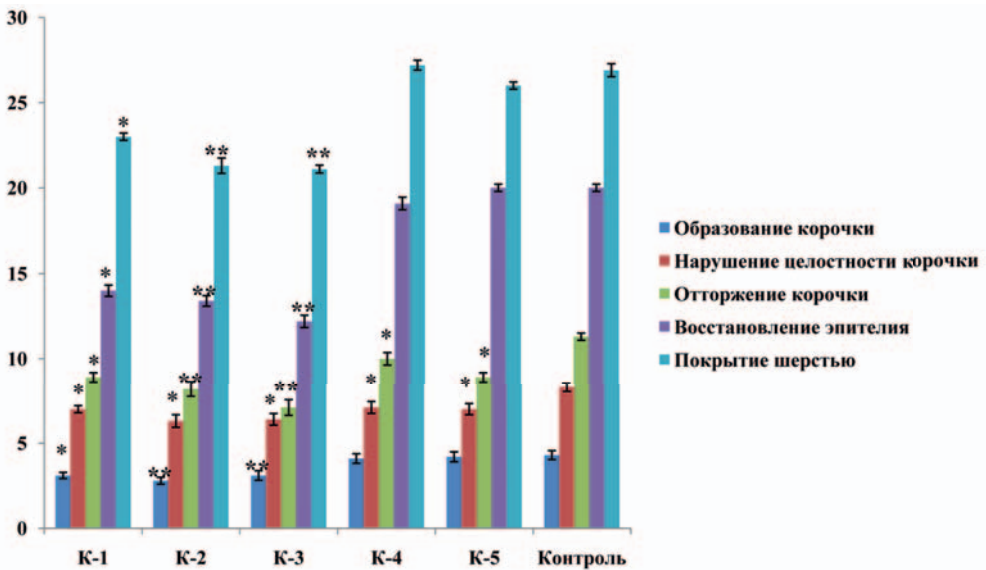


Рис. 2. Эпителизация ожоговых ран на фоне исследуемых мягких лекарственных форм у крыс (в днях).

Примечание: статистические показатели: среднее±стандартная ошибка; * — значения, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей в контрольной (нелеченой) группе, при $p < 0,05$ (критерий Манна—Уитни); ** — значения, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей в контрольных (нелеченой и леченных основами, без экстракта) группах, при $p < 0,05$ (критерий Манна—Уитни).

Fig. 2. Epithelialization of burn wounds in view of the studied soft dosage forms for rats (in days).

Note: statistical indicators: mean±standard error; * — values that significantly differ from the corresponding indicators in the control (untreated) group at $p < 0.05$ (Mann—Whitney test); ** — values that significantly differ from the corresponding indicators in the control (untreated and treated with bases, without extract) groups at $p < 0.05$ (Mann—Whitney test).

между группами крыс, лечеными основными (К-4 и К-5), и контролем (К) не обнаружено достоверных отличий.

Таким образом, при применении мягких лекарственных форм с экстрактом *P. grandiflora* отмечены достоверные различия на каждой стадии эпителизации ожоговых ран у групп крыс в сравнении с контролем (нелеченой группой крыс). А также образование корочки, восстановление эпителия и покрытие шерстью в этих группах происходит достоверно быстрее, чем в группах крыс, леченных основными без экстракта (рис. 2).

При применении ланолина и вазелина (с экстрактом *P. grandiflora*) сроки эпителизации ран у крыс несколько замедляются по сравнению с группами, лечеными

К-2 и К-3, на 1–2 дня. Влияние основы на проводимость действующих веществ показывают и литературные данные [5]. При использовании карбопола и гидрокрема с экстрактом *P. grandiflora* не отмечено отличий по времени эпителизации ран у экспериментальных животных.

Выводы

В эксперименте на лабораторных животных установлено, что три (К-1, К-2 и К-3) экспериментальные мягкие лекарственные формы, содержащие сухой экстракт *P. grandiflora*, обладают противовоспалительным и ранозаживляющим эффектом при термическом ожоге с сокращением срока заживления ран у крыс в среднем на 6–8 сут. по сравнению с контролем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ажикова А.К., Лазыко М.В., Ажиков А.С. Терапевтический эффект использования кедрового масла при ожоговой травме. *Естественные науки*. 2008;4(25):75–77. [Azhikova A.K., Lazko M.V., Azhikov A.S. Terapevticheskij e'ffekt ispol'zovaniya kedrovogo masla pri ozhogovoj travme [The therapeutic effect of using cedar nut oil for burn injury]. *Estestvenny'e nauki [Natural Sciences]*. 2008;4(25):75–77. (In Russian)].
2. Алексеева Л.И., Болотник Е.В. Розмариновая кислота и антиоксидантная активность *Prunella grandiflora* и *Prunella vulgaris* (Lamiaceae). *Растительный мир Азиатской России*. 2013;11(1):121–125. [Alekseeva L.I., Bolotnik E.V. Rozmarinovaya kislota i antioksidantnaya aktivnost' *Prunella grandiflora* i *Prunella vulgaris* (Lamiaceae) [Rosmarinic acid and antioxidant activity of *Prunella grandiflora* and *Prunella vulgaris* (Lamiaceae)]. *Rastitel'nyj mir Aziatskoj Rossii [The flora of Asian Russia]*. 2013;11(1):121–125. (In Russian)].
3. Буданцев А.А., Лесиовская Е.Е. Розмариновая кислота: источники и биологическая активность. *Растительные ресурсы*. 2012;48(3):453–468. [Budantsev A.A., Lesiovskaya E.E. Rozmarinovaya kislota: istochniki i biologicheskaya aktivnost' [Rosemarinic acid: sources and biological activity]. *Rastitel'ny'e resursy' [Растительные ресурсы]*. 2012;48(3):453–468. (In Russian)].
4. Волков А.А., Ларионов Л.П., Забокрицкий Н.А., Хонина Т.Г., Тосова И.Н., Федотова Е.В., Мишечкина А.А., Кочеткова В.Е., Тарасова Е.В. Разработка и доклиническое изучение инновационных композиций мягкой лекарственной формы на основе диметилдиглицероксицилана при термической травме. *Биомедицина*. 2010;5:71–73. [Volkov A.A., Larionov L.P., Zabokriczkij N.A., Xonina T.G., Tosova I.N., Fedotova E.V., Mishechikina A.A., Kochetkova V.E., Tarasova E.V. Razrabotka i doklinicheskoe izuchenie innovacionny'x kompozicij myagkoj lekarstvennoj formy' na osnove dimetildigliceroksisilana pri termicheskoj travme [Development and preclinical study of innovative compositions of soft dosage form based on dimethyl diglyceroxysilane for thermal injury]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2010;5:71–73. (In Russian)].
5. Гаврилов А.С. *Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных препаратов*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010:624. [Gavrilov A.S. *Farmaceuticheskaya tehnologiya. Izgotovlenie lekarstvenny'x preparatov [Pharmaceutical technology. Manufacturing of medicines]*. Moscow: GE'OTAR-Media Publ., 2010:624. (In Russian)].
6. Гуськова Т.А. *Токсикология лекарственных средств*. М.: Русский врач. 2003:76. [Guskova T.A. *Toksikologiya lekarstvenny'x sredstv [Drug toxicology]*. Moscow: Russkij vrach Publ., 2003:76. (In Russian)].
7. Курчатова М.Н., Дурнова Н.А. Влияние растительных экстрактов на индукцию микроядер циклофосфаном в эритроцитах крови беспородных белых мышей. *Цитология*. 2015;57(6):452–458. [Kurchatova M.N., Durnova N.A. Vliyanie rastitelny'kh ekstraktov na indukcionny'ye mikroyadery ciklofosfanom v eritrocitax krvi besporodny'kh belyx myshej. *Citologiya*. 2015;57(6):452–458. (In Russian)].

- tel'ny'h e'kstraktov na indukciyu mikroyader ciklofosfanom v e'ritrocitax krovi besporodny'x bely'x my'shej [Influence of plant extracts on the induction of micronuclei by cyclophosphamide in erythrocytes of blood of outbred white mice]. *Cytology*. 2015;57(6):452–458. (In Russian)].
8. Лесиовская Е.Е. *Доказательная фитотерапия*. М: Ремедиум, 2014:224. [Lesiovskaya E.E. *Dokazatel'naya fitoterapiya [Evidence-based herbal medicine]*. Moscow: Remedium Publ., 2014:224. (In Russian)].
 9. Хабриев Р.У. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина, 2013:942. [Khabriev R.U. *Rukovodstvo po e'ksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novy'h farmakologicheskikh veshhestv [Guidelines for experimental (pre-clinical) study of new pharmacological substances]*. Moscow: Meditsina Publ., 2013:942. (In Russian)].
 10. Чмырев И.В., Бутрин Я.Л. Консервативное лечение ожогов лица. *Медицинский вестник Юга России*. 2020;11(2):129–133. [Chmyrev I.V., Butrin Ya.L. Konservativnoe lechenie ozhogov licza [Conservative treatment of facial burns]. *Medicinskij vestnik Yuga Rossii [Medical Bulletin of the South of Russia]*. 2020;11(2):129–133. (In Russian)].
 11. Шамилов А.А. Растения рода *Prunella*: химический состав, виды фармакологического действия. *Вестник ВГУ, Серия: Химия, Биология, Фармация*. 2017;4:152–160. [Shamilov A.A. Rasteniya roda *Prunella*: himicheskij sostav, vidy' farmakologicheskogo dejstviya [Plants of the *Prunella* genus: chemical composition, types of pharmacological action]. *Voronezh State University Bulletin, Series: Chemistry, Biology, Pharmacy*. 2017;4:152–160. (In Russian)].
 12. Qiang Z., Ye Z., Hauck C., Murphy P.A., McCoy J.-A., Widrlechner M.P., Reddy M., Hendrich S. Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extract across Caco — 2 cell monolayers. *J. of Ethno pharmacology*. 2011;137:1107–1112.
 13. Oh C.S., Price J., Brindley M.A., Widrlechner M.P., Qu L., McCoy J.-A., Murphy P., Hauck C., Maury W. Inhibition of HIV-1 infection by aqueous extracts of *Prunella vulgaris* L. *Virology J*. 2011;8:188–197.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Болотник Елизавета Витальевна*, к.б.н., ФГБУН «Ботанический сад» Уральского отделения РАН;
e-mail: LizaVB@yandex.ru

Алексеева Людмила Ивановна, к.х.н., ФГБУН «Ботанический сад» Уральского отделения РАН;
e-mail: alexeeva@ib.komisc.ru

Ларионов Леонид Петрович, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: leonid-larionov@mail.ru

Elizaveta V. Bolotnik*, Cand. Sci. (Biol.), Botanical Garden of the Ural Branch of RAS;
e-mail: LizaVB@yandex.ru

Lyudmila I. Alekseeva, Cand. Sci. (Chem.), Botanical Garden of the Ural Branch of RAS;
e-mail: alexeeva@ib.komisc.ru

Leonid P. Larionov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Ural State Medical University;
e-mail: leonid-larionov@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОСУДОВ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ПОЛОСТИ РТА В ХОДЕ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАНЕВОГО ДЕФЕКТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПОЛИМЕРНОЙ МЕМБРАНЫ

А.Д. Коняева*, Е.Ю. Варакута, А.Е. Лейман

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

Цель работы — изучить морфофункциональные изменения сосудов микроциркуляторного русла слизистой оболочки полости рта в ходе регенерации раневого дефекта при использовании полимерной мембраны и без нее.

Эксперимент проводился на 35-ти белых крысах Wistar, разделённых на три группы: контрольная, экспериментальная № 1 и экспериментальная № 2. Для формирования раневого дефекта иссекался лоскут слизистой оболочки полости рта, который у крыс группы № 2 перекрывался полимерной пьезоэлектрической мембраной. Гистологическое исследование осуществляли на 3-и, 7-е и 12-е сутки — производили взятие контрольного материала, изготавливали гистологические препараты по стандартной методике. В очаге поражения и окружающих его тканях определяли удельные площади и численные плотности артериол, венул и капилляров, вычисляли индекс перикапиллярной диффузии, индекс Керногана и артериоло-венулярное соотношение.

На 3-и сутки все показатели в экспериментальных группах достоверно не отличались между собой, но имели значимые различия с контрольной группой. На 7-е сутки исследования в группе № 1 численная плотность открытых артериол и венул соответствовала таковой в группе контроля. В группе № 2 значимо отличалась от контроля численная плотность капилляров и измененных венул, а также индекс перикапиллярной диффузии. На 12-е сутки исследования в группе без покрытия численная плотность открытых венул достигала контрольных значений. В группе № 2 все показатели соответствовали контрольным.

Защита раневого дефекта от микробной контаминации и повторной травматизации, наличие пьезоэлектрических свойств у мембраны способствовали более эффективному восстановлению сосудов микроциркуляторного русла, что доказывало эффективность ее использования в качестве раневого покрытия.

Ключевые слова: раневой дефект, сополимер винилиденфторида с тетрафторэтиленом, слизистая оболочка полости рта, воспаление, раневое покрытие, сосуды

Благодарность: авторы выражают признательность к.т.н., младшему научному сотруднику лаборатории гибридных биоматериалов Томского политехнического университета Е.Н. Большасову за разработку и предоставление мембраны для закрытия раневых дефектов.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Коняева А.Д., Варакута Е.Ю., Лейман А.Е. Морфофункциональные изменения сосудов микроциркуляторного русла в слизистой оболочке полости рта в ходе заживления раневого дефекта при использовании полимерной мембраны. *Биомедицина*. 2021;17(4):57–67. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-57-67>

Поступила 01.06.2020

Принята после доработки 05.04.2021

Опубликована 10.12.2021

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN ORAL MUCOSA VESSELS WHEN HEALING A WOUND DEFECT USING A POLYMER MEMBRANE

Anastasiia D. Koniaeva*, Elena Yu. Varakuta, Arina E. Leuman

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

This work aims to study morphofunctional changes in the vessels of the oral mucosa during regeneration of a wound defect with and without a polymer membrane.

An experiment was carried out on 35 white Wistar rats divided into three groups: control, experimental 1 and experimental 2. To form a wound defect, a flap of the oral mucosa was excised, which was covered by a polymeric piezoelectric membrane in the rats of group 2. Histological examination was carried out on the 3rd, 7th and 12th days: the control material was taken, histological preparations were made according to the standard method. In the lesion focus and surrounding tissues, specific areas and numerical densities of arterioles, venules and capillaries were determined; the pericapillary diffusion index, Kernogan index and arterio-venular ratio were calculated.

On the 3rd day, all indicators in all experimental groups did not significantly differ from each other, but had significant differences from the control group. On the 7th day of the study, in the 1st group, the numerical density of open arterioles and venules corresponded to the control group. In group 2, the numerical density of capillaries and altered venules, as well as the index of pericapillary diffusion, significantly differed from the control. On the 12th day of the study, the numerical density of open venules reached control values in the uncoated group. In the 2nd group, all indicators corresponded to the control values.

Protection of the wound defect from microbial contamination and re-traumatization, the presence of piezoelectric properties of the membrane under study contributed to a more effective restoration of vessels. This confirms the efficacy of the membrane under study when used as a wound covering.

Keywords: wound defect, copolymer of vinylidene fluoride with tetrafluoroethylene, oral mucosa, inflammation, wound covering, blood vessels

Acknowledgments: the authors express their gratitude to E.N. Bolbasov, Cand. Sci. (Tekh.), junior researcher of the laboratory of hybrid biomaterials of the Tomsk Polytechnic University for the development and provision of a membrane for closing wound defects.

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

For citation: Koniaeva A.D., Varakuta E.Yu., Leuman A.E. Morphofunctional Changes in Oral Mucosa Vessels when Healing a Wound Defect Using a Polymer Membrane. *Journal Biomed.* 2021;17(4):57–67. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-57-67>

Submitted 01.06.2020

Revised 05.04.2021

Published 10.12.2021

Введение

Раневой процесс — сложный комплекс местных и общих биологических реакций организма, возникающий в ответ на повреждение тканей, направленный на восстановление их анатомической и функциональной целостности. Восстановление параметров сосудистой сети в ране и по ее периферии является основной частью процесса зажив-

ления. Реакция микрососудов в зоне повреждения является одной из самых ранних и имеет непосредственное отношение к развитию воспаления и регенерации, и от нее в последствии зависит прогноз относительно постранных осложнений. Именно поэтому необходимо создавать благоприятные условия для восстановления сосудов микроциркуляторного русла [1].

Открытые раны слизистой оболочки полости рта постоянно подвергаются механической, химической и физической травматизации, в результате чего происходит нарушение целостности молодых сосудов грануляционной ткани [6]. Поэтому ставится под сомнение традиционный способ ведения ран, когда их поверхность оставляется открытой. Перспективным направлением в этой области является разработка раневых покрытий, которые бы защищали дефект от агрессивных воздействий внешней среды [2, 5]. Примером таких покрытий является полимерная мембрана на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом (VDF-TeFE) сформированная методом электроформования в лаборатории гибридных биоматериалов Томского политехнического университета. Обладая пьезоэлектрическими свойствами, она не только защищает раневой дефект от внешних воздействий, но и способствует стимуляции регенеративных процессов, а также является инертной по отношению к организму [7, 8].

Таким образом, **целью** данного исследования является изучение эффективности использования полимерных пьезоэлектрических мембран для закрытия раневых дефектов при восстановлении микроциркуляторного русла в слизистой оболочке полости рта.

Материалы и методы

Исследование одобрено локальным комитетом по этике ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Экспериментальная часть была проведена на 35-ти белых крысах-самцах Wistar массой 220–280 г, выведенных в лаборатории биологических моделей СибГМУ, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животные были разделены на три группы, где контрольная (n=5) — интактные крысы, крысам экспериментальных групп № 1 и № 2 было произведено иссечение лоскута слизистой

оболочки губы с формированием раневого дефекта размером 7x4 мм. У животных экспериментальной группы № 1 (n=15) дефект оставлялся открытым, что соответствовало традиционной методике лечения раневых поверхностей в полости рта, животным экспериментальной группы № 2 (n=15) раневой дефект перекрывался полимерной мембраной с медным напылением, которая фиксировалась по краям раны узловыми швами (рис. 1), сторона с медным напылением была направлена в сторону раневого дефекта. Оперативное вмешательство проводилось под внутримышечным наркозом препаратом «Золетил».

Выведение животных из эксперимента осуществляли на 3-и, 7-е и 12-е сут. исследования путем введения их в состояние гипоксии в CO₂-камере. Макроскопически проводили визуальную оценку раны, осуществляя фотопротокол, после этого из области ранее сформированного дефекта иссекали мягкие ткани для изготовления гистологических препаратов. Препараты для световой микроскопии изготавливали по традиционной методике. Полученные на санном микротоме срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эо-



Рис. 1. Оперативное вмешательство: иссечение слизистой оболочки губы, перекрытие раневого дефекта полимерной мембраной.

Fig. 1. Surgical intervention: excision of the mucous membrane of the lip, overlapping of the wound defect with a polymer membrane.

зином. Проводили качественную и количественную гистологическую оценку. Определяли относительную площадь и численную плотность измененных и открытых артериол, венул и капилляров, вычисляли индекс перикапиллярной диффузии (площадь ткани, которую кровоснабжает один капилляр) как соотношение среднего диаметра капилляров к их удельной площади, индекс Керногана (показатель пропускной способности микроциркуляторного русла) как соотношение толщины сосудистой стенки артериол к радиусу их просвета и артериоло-венулярное взаимоотношение. Измеряли удельную площадь новообразованных сосудов в грануляционной ткани. Подсчет показателей проводили в программе ImageJ.

Статистическую обработку осуществляли в программе Statistica 10.0. Проверку гипотезы о нормальности распределения осуществляли при помощи критерия Колмогорова—Смирнова. Поскольку распределение значений всех количественных признаков не соответствовало критериям нормального, при сравнении независимых выборок использовали критерий Манна—Уитни, для парных сравнений использовали критерий Вилкоксона. Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты исследований

На 3-и сут. исследования во всех экспериментальных группах в собственной пластинке слизистой оболочки полости рта в областях, окружающих рану, наблюдались измененные сосуды: со стазом, сладжем форменных элементов, тромбозом. Стенки артериол были утолщены, сосуды были окружены периваскулярным отеком (рис. 2А, Б).

Качественные изменения в сосудах сопровождались количественными изменениями показателей гемодинамики и микроциркуляции. Численная плотность измененных артериол и венул внутри групп значимо

не отличалась, но была в 5,2 и 12,7 раза достоверно больше, чем в контрольной группе. Кроме того, во всех экспериментальных группах можно было наблюдать достоверное уменьшение численной плотности открытых артериол по сравнению с контрольной группой. Удельная площадь артериол в экспериментальных группах достоверно не отличалась друг от друга, но была в 1,65 раза значимо меньше, чем в контрольной группе. Достоверных отличий удельной площади венул и капилляров в экспериментальных группах также не выявлялось, при этом данные показатели были в 1,4 и в 2,5 раза значимо больше, чем в контрольной группе (табл. 1).

Данные различия можно объяснить тем фактом, что на 3-и сут. заживления раны преобладали воспалительная реакция травмированных тканей, в ходе которой наблюдалось расширение просвета венул и капилляров и сужение просвета артериол.

Так, артериоло-венулярное взаимоотношение в экспериментальных группах достоверно не отличалось и в 1,9 раза было достоверно меньше, чем в контрольной группе (табл. 2). Этот факт свидетельствовал о венозном застое в микроциркуляторном русле слизистой оболочки полости рта, что являлось естественным процессом для воспалительной стадии регенерации раневого дефекта.

Показатели гемодинамики в тканях, окружающих раневой дефект, ухудшались. Так, индекс перикапиллярной диффузии и индекс Керногана достоверно не отличались в экспериментальных группах, но в 1,7 раза были достоверно ниже и в 2 раза достоверно выше, соответственно, чем в контрольной группе (табл. 2). Изменение этих показателей свидетельствовало об ухудшении кровоснабжения собственной пластинки слизистой оболочки полости рта.

В грануляционной ткани наблюдалось большое количество новообразованных сосудов с тонкими стенками (рис. 2Б).

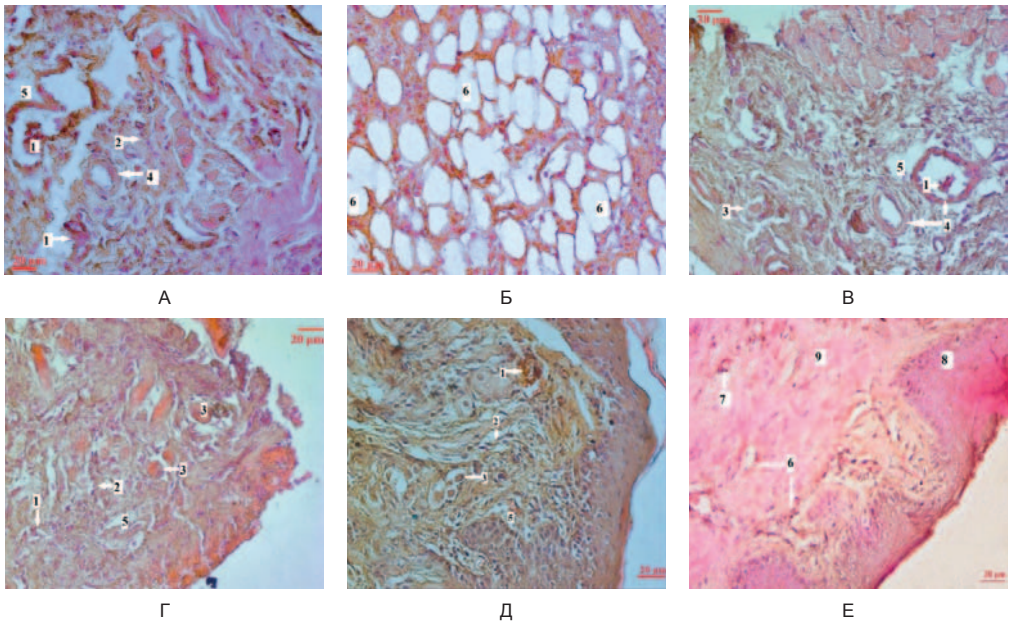


Рис. 2. Слизистая оболочка губы крысы. Ув. $\times 400$. Окраска: гематоксилин и эозин.
 Обозначения: 1 — стаз, 2 — сгусток, 3 — тромбоз, 4 — утолщение стенок артериол, 5 — периваскулярный отек, 6 — венулы, 7 — капилляры, 8 — эпителий, 9 — рыхлая волокнистая соединительная ткань.
 А — группа № 1 в 3-и сут.; Б — группа № 2 в 3-и сут.; В — группа № 1 в 7-е сут.; Г — группа № 2 в 7-е сут.; Д — группа № 1 в 12-е сут.; Е — группа № 2 в 12-е сут.

Fig. 2. Rat lip mucosa. Magn. $\times 400$. Coloring: hematoxylin, eosin.
 Designations: 1 — stasis, 2 — sludge, 3 — thrombosis, 4 — thickening of the arteriole walls, 5 — perivascular edema, 6 — venules, 7 — capillaries, 8 — epithelium, 9 — loose fibrous connective tissue.
 А — group No. 1 on the 3rd day; Б — group No. 2 on the 3rd day; В — group No. 1 on the 7th day; Г — group No. 2 on the 7th day; Д — group No. 1 on the 12th day; Е — group No. 2 on the 12th day.

Удельная площадь сосудов грануляционной ткани не отличалась между группами и составляла 52,2 (40,45;43,3) (табл. 1).

Таким образом, на 3-и сут. исследования на месте раневого дефекта и по периферии от него наблюдались типичные для данной фазы регенерации раневого дефекта явления: венозный застой в виде сохранения периваскулярного отека из-за истончения сосудистой стенки и увеличения ее проницаемости; патологические изменения сосудов — стаз, сгусток форменных элементов и тромбоз; ухудшение показателей гемодинамики. Данные изменения вызваны необходимостью ограничить раневой дефект и не допустить распространение инфекции и продуктов распада клеток и тканей по ор-

ганизму. В то же время в грануляционной ткани происходило активное образование молодых сосудов, что свидетельствовало об активном процессе регенерации раневого дефекта.

На 7-е сут. исследования по периферии от раневого дефекта по-прежнему наблюдались измененные сосуды микроциркуляторного русла со сгустком, стазом и тромбозом. Периваскулярный отек сохранялся. Вокруг сосудов обнаруживалось большое скопление клеточных элементов (рис. 2В, Г).

Численная плотность измененных артериол в группе с раневым покрытием была достоверно (в 3,9 раза) меньше, чем в группе без покрытия, и приближалась к показателю в контрольной группе. Численная

Таблица 1. Удельная площадь и численная плотность сосудов слизистой оболочки полости рта при использовании защитного покрытия и без него
Table 1. Specific surface area and number density of the vessels of the oral mucosa with and without a protective coating

Группа	Удельная площадь артериол	Удельная площадь щадь венул	Удельная площадь капилляров	Численная плотность артериол, в 1 мм ² среза	Численная плотность артериол, в 1 мм ² среза	Численная плотность артериол, в 1 мм ² среза	Численная плотность артериол, в 1 мм ² среза	Численная плотность артериол, в 1 мм ² среза	Численная плотность артериол, в 1 мм ² среза	Численная плотность артериол, в 1 мм ² среза	Численная плотность артериол, в 1 мм ² среза	Удельная площадь щадь сосудов в грануляционной ткани, в 1 мм ² среза
Контроль (n=5)	2,3 (2,2;2,3)	5,4 (5,2;6,65)	1,34 (0,95;1,68)	65,9 (62,2;68,3)	-	79,4 (76,85;83,4)	-	189,4 (185,2;193,1)	-	-	-	-
3-й сут.												
1-я группа (n=5)	1,4 (1,3;1,5)*	7,4 (7,2;7,5)*	3,1 (2,9;3,2)*	51,7 (50,7;53,2)*	5,2 (5,0;5,3)*	60,4 (58,85;62,15)	12,7 (12,1;13,1)*	201,6 (200,05;203,5)	20,6 (20,4;20,8)*	204,6 (203,4;205,3)*	51,5 (50,85;52,3)*	52,2 (40,45;43,3)*
2-я группа (n=5)	1,4 (1,2;1,5)*	7,7 (7,6;7,8)*	3,3 (3,2;3,4)*	54,4 (53,55;55,15)*	3,9 (3,7;4,0)*	69,9 (69,25;70,5)	10,8 (10,4;11,15)*	204,6 (203,4;205,3)*	20,6 (20,4;20,8)*	204,6 (203,4;205,3)*	51,5 (50,85;52,3)*	51,5 (50,85;52,3)*
7-е сут.												
1-я группа (n=5)	1,6 (1,5;1,7)*	8,1 (8,02;8,2)*	3,5 (3,4;3,6)*	63,3 (62,6;63,7)	4,3 (4,2;4,5)*	62,7 (61,9;64,3)	10,45 (10,1;10,8)*	205,8 (204,6;207,1)*	20,6 (20,4;20,8)*	205,8 (204,6;207,1)*	17,4 (16,6;17,75)*	17,4 (16,6;17,75)*
2-я группа (n=5)	2,2 (2,1;2,3)#	6,05 (5,82;6,2)#	1,9 (1,8;2,0)#	72,5 (72,1;72,7)#	0,8 (0,7;0,9)#	77,3 (76,7;77,8)#	3,4 (3,3;3,5)#	218,4 (218,0;218,9)#	3,4 (3,3;3,5)#	218,4 (218,0;218,9)#	27,0 (26,5;27,4)#	27,0 (26,5;27,4)#
12-е сут.												
1-я группа (n=5)	1,4 (1,2;1,5)*	4,1 (3,9;4,45)*	0,8 (0,8;0,9)*	46,7 (46,1;47,25)*	2,2 (2,0;2,4)*	57,8 (56,75;58,7)	6,8 (6,5;7,1)*	144,8 (143,2;146,9)*	6,8 (6,5;7,1)*	144,8 (143,2;146,9)*	-	-
2-я группа (n=5)	3,2 (3,05;3,4)*#	6,3 (6,2;6,5)#	2,1 (1,9;2,1)#	73,4 (72,8;73,6)#	-	83,0 (82,3;83,75)#	-	231,5 (230,5;233,2)#	-	231,5 (230,5;233,2)#	-	-

Примечание: * — достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$); # — достоверные различия по сравнению с группой, в которой не использовалось раннее покрытие ($p \leq 0,05$).

Note: * — the differences are significant compared with the control group ($p \leq 0,05$); # — significant differences compared to the group that did not use wound dressing ($p \leq 0,05$).

Таблица 2. Показатели гемодинамики сосудов слизистой оболочки полости рта при использовании защитного покрытия и без него
Table 2. Indicators of hemodynamics of the oral mucosa vessels with and without a protective coating

Группа	Артериоло-венулярное взаимоотношение	Индекс перикапиллярной диффузии	Индекс Керногана
Контроль (n=5)	0,72 (0,67;0,76)	6,04 (4,65;8,29)	0,61 (0,56;0,65)
3-и сут.			
группа № 1 (n=5)	0,38 (0,37;0,39)*	3,6 (3,4;3,8)*	1,22 (1,18;1,28)*
группа № 2 (n=5)	0,44 (0,44;0,45)*	3,6 (3,4;3,75)*	1,01 (1,0;1,04)*
7-е сут.			
группа № 1 (n=5)	0,45 (0,44;0,46)*	3,0 (2,8;3,1)*	1,16 (1,12;1,21)*
группа № 2 (n=5)	0,76 (0,74;0,77)#	3,6 (3,5;3,9)#	0,56 (0,55;0,57)#
12-е сут.			
группа № 1 (n=5)	0,57 (0,56;0,59)*	9,75 (9,0;10,37)*	0,83 (0,82;0,85)*
группа № 2 (n=5)	0,77 (0,75;0,79)#	4,85 (4,59;4,15)#	0,53 (0,52;0,55)#

Примечание: * — достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$); # — достоверные различия по сравнению с группой, в которой не использовалось раневое покрытие ($p \leq 0,05$).

Note: * — the differences are significant compared with the control group ($p \leq 0,05$); # — significant differences compared to the group that did not use wound dressing ($p \leq 0,05$).

плотность измененных венул в группе № 2 в 1,7 и 3 раза была достоверно меньше, чем в группе № 1, но при этом значительно больше, чем в контрольной группе. Достоверно увеличивалась численная плотность капилляров в 1,1 для группы № 1 и в 1,2 раза для группы № 2 по сравнению с контрольной. Численная плотность открытых артериол и венул в группе № 2 в 1,15 и 1,24 раза была достоверно выше, чем в группе без раневого покрытия (табл. 1). Вышеизложенные факты свидетельствовали об активации резервных источников кровоснабжения тканей, что особенно было выражено в группе с покрытием.

Артериоло-венулярное взаимоотношение в группе № 2 достигало контрольных значений. Артериоло-венулярное взаимоотношение в группе № 1 было в 1,6 раза достоверно ниже, чем в группе контроля (табл. 2).

В группе № 2 индекс перикапиллярной диффузии был в 1,4 раза достоверно больше, а индекс Керногана в 2 раза достоверно меньше, чем в группе № 1. При этом индекс Керногана в группе № 2 достигал контрольных значений (табл. 2), что говорило о восстановлении пропускной способности артериол и улучшении гемодинамики в артериальном русле при использовании полимерной мембраны.

Количество тонкостенных сосудов грануляционной ткани уменьшалась по сравнению с 3-ми сут. исследования, что было связано с созреванием сосудистой стенки и переходом сосудов в ранг зрелых, а также с их облитерацией в связи с развитием рубцовой ткани. Удельная площадь сосудов в группе № 2 была в 1,6 раза значительно больше, чем в группе № 1 (табл. 1).

На 7-е сут. заживления раневого дефекта можно было наблюдать соответствие практически всех (за исключением индекса перикапиллярной диффузии) показателей микроциркуляторного русла контрольным значениям в экспериментальной группе

№ 2. В группе без использования раневого покрытия практически все показатели достоверно отличались от контрольных значений.

На 12-е сут. исследования периваскулярный отек сохранялся в группе № 1, но его выраженность снижалась. Измененные сосуды со стазом, сладжем и тромбозом встречались в единичных полях зрения (рис. 2Д). В группе с покрытием патологических изменений сосудов не наблюдалось (рис. 2Е).

Численная плотность венул и артериол в группе, где использовалось раневое покрытие, не отличалась от показателей в интактной слизистой оболочке, а численная плотность капилляров была в 1,2 раза достоверно больше, чем в контрольной группе. Численная плотность артериол, венул и капилляров в группе без раневого покрытия в 1,3 раза была достоверно меньше, чем в группе контроля. Это было связано, по всей видимости, с сокращением относительной площади рыхлой волокнистой соединительной ткани и превалированием рубцовой соединительной ткани на месте бывшего раневого дефекта.

Удельная площадь сосудов в группе № 2 не отличалась от контрольных значений, а в группе № 1 в 1,6, 1,3 и 1,7 раза была достоверно ниже, чем в контрольной группе для артериол, венул и капилляров соответственно. Это также связано с облитерацией сосудов в связи с развитием рубцовой ткани на месте раневого дефекта (табл. 1).

Артериоло-венулярное соотношение в группе № 2 достоверно не отличалось от контрольных значений и было в 1,4 раза достоверно больше, чем в группе № 1. В группе с раневым покрытием индекс перикапиллярной диффузии и индекс Керногана соответствовали интактной слизистой оболочке и в 2,1 и 1,6 раза были достоверно меньше, чем в группе № 1. В группе без мембраны данные показатели в 1,6 и 1,4 раза были достоверно больше, чем в контрольной группе (табл. 2).

Таким образом, на 12-е сут. исследования в группе с использованием защитного раневого покрытия все значения соответствовали контрольным, в то время как без него в тканях еще наблюдались патологические изменения сосудов и нарушение показателей гемодинамики. Кроме того, в результате развития рубцовой соединительной ткани в группе № 1 уменьшалась численная плотность молодых сосудов.

Обсуждение результатов

Последовательность сосудистых реакций в ране имеет свои закономерности и зависит от стадии раневого процесса [3, 4], что и продемонстрировало данное исследование.

Так, на 3-и сут. исследования, в фазу воспаления, наблюдалась ярко выраженная сосудистая реакция по периферии от раны, которая проявлялась в резком увеличении диаметра венул и капилляров и сужении просвета артериол. Это, в свою очередь, способствовало венозному застою и развитию отека, в результате которых раневой дефект ограждался от здоровых тканей, не позволяя продуктам распада клеток и бактериям распространяться по организму. Кроме того, отек способствовал сближению краев раны, что благоприятно сказывалось на дальнейшем заживлении. Из расширенных сосудов с истонченной сосудистой стенкой и нарушенными межклеточными контактами в окружающие ткани мигрировали клетки лимфогистиоцитарного ряда для осуществления иммунных реакций. Также в этот период наблюдалось большое количество измененных сосудов с тромбозом, сладжем форменных элементов и периваскулярным отеком.

Постепенно фаза воспаления переходила в фазу пролиферации, которая на 7-е сут. протекала наиболее активно. Диаметр сосудов постепенно восстанавливался, снижалась степень выраженности периваскулярного отека, сосудистые стенки приобретали

толщину, соответствующую контрольным значениям. Количество измененных сосудов также снижалось, сосуды с тромбозом и сладжем визуализировались только в отдельных полях зрения. Подобные позитивные изменения микроциркуляторного русла были наиболее выражены в группе с раневым покрытием, которое защищало рану от агрессивных воздействий внешней среды.

12-е сут. соответствовали процессу регенерации раны и возвращению тканей в первоначальное состояние. В группе с раневым покрытием все показатели достигали контрольных значений: диаметр сосудов восстанавливался, измененные сосуды не визуализировались, ткань была богато васкуляризирована. В группе без раневого покрытия ряд показателей не достигал контрольных значений, а удельная плотность сосудов уменьшалась по сравнению с контрольной группой из-за развития рубцовой ткани. Это, по всей видимости, было связано с постоянной травматизацией незащищенной раневой поверхности [9, 10].

Неоангиогенез являлся базисным механизмом заживления раны. Процесс регенерации был связан с развитием грануляционной ткани и образованием капилляров, формирование которых в разные фазы раневого процесса неодинаково. Так, на 3-и сут. исследования наблюдалось активное образование капилляров микроциркуляторного русла в грануляционной ткани, их удельная площадь занимала практически половину от общей площади зоны заживления. У новообразованных сосудов визуализировалась тонкая стенка, их просвет был расширен. На 7-е сут. исследования площадь молодых сосудов относительно общей площади грануляционной ткани уменьшилась в 3 раза для группы № 1 и в 2 раза для группы № 2, что было связано, с одной стороны, с развитием рыхлой волокнистой соединительной ткани и, как следствие, их закрытием, а с другой

стороны, с облитерацией сосудов в связи с развитием рубцовой ткани в дальнейшем. Исходя из этого, можно предположить, что в группе с покрытием степень развития рубцовой ткани в дальнейшем будет менее выражена, чем в группе без покрытия, т.к. удельная площадь сосудов в этих группах достоверно выше.

Заключение

Использование защитной пьезоэлектрической мембраны для закрытия раневого дефекта ускоряло восстановление кровоснабжения в слизистой оболочке полости рта. При этом большинство показателей достигало контрольных значений уже на 7-е сут. исследования в группе, где использовалась полимерная мембрана с напылением меди. Также к показателям контроля возвращалось артериоло-венулярное взаимоотношение и индекс Керногана, что было признаком восстановления кровоснабжения в артериоло-венулярном русле.

В группе, где раневой дефект оставался открытым, что соответствовало традиционной методике лечения раневого

дефекта, на 12-е сут. исследования не все показатели достигали контрольных значений, к тому же наблюдалось снижение численной плотности сосудов в связи с развитием рубцовой соединительной ткани. В группе № 1 по-прежнему была нарушена пропускная способность артериол, которая выражалась в увеличении индекса Керногана, что было связано с утолщением сосудистой стенки. Численная плотность капилляров была снижена по сравнению с контрольной группой, что указывало на то, что кровоснабжение области раневого дефекта еще не восстановилось в полном объеме и имелись обширные участки рубцовой ткани, где оно отсутствовало полностью. Также в группе без покрытия визуализировались измененные сосуды с тромбозом и сладжем.

Таким образом, закрытие ран слизистой оболочки полости рта полимерной пьезоэлектрической мембраной благоприятно влияло на восстановление кровоснабжения данной области и, как следствие, на более благоприятный прогноз заживления раневого дефекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Быков В.Л., Леонтьева И.В., Кулаева В.В., Исеева Е.А. Тканевая, клеточная и молекулярная биология гемостаза и реэпителизации при заживлении ран слизистой оболочки полости рта. *Морфология*. 2019;156(6):64–76. [Bykov V.L., Leont'eva I.V., Kulaeva V.V., Iseeva E.A. Tkanevaya, kletochnaya i molekulyarnaya biologiya gemostaza i reepitelizatsii pri zazhivlenii ran slizистой оболочки полости рта [Tissue, cell and molecular biology of hemostasis and re-epithelialisation during regeneration of oral mucous wounds]. *Morfologiya [Morphology]*. 2019;156(6):64–76. (In Russian)].
2. Киселев И.Л., Хвостовой В.В., Ворона Ю.С., Романишев В.Е., Ворона И.С. Пути улучшения заживления послеоперационных ран в хирургическом лечении местно-распространенных опухолей головы и шеи. *Опухоли головы и шеи*. 2013;1:29–32. [Kiselev I.L., Hvostovoy V.V., Vorona Yu.S., Romanishchev V.E., Vorona I.S. Puti uluchsheniya zazhivleniya posleoperatsionnyh ran v hirurgicheskom lechenii mestno-rasprostranennyh opuholej golovy i shei [Ways to improve the healing of postoperative
3. Митронов В.И., Гилева И.И. Раневой процесс: современные аспекты патогенеза. *Сибирский медицинский журнал*. 2009;6:20–25. [Mironov V.I., Gileva I.I. Ranevoj process: sovremennye aspekty patogeneza [Wound process: the modern aspects of pathogenesis]. *Siberian Medical Journal*. 2009;6:20–25. (In Russian)].
4. Поройский С.В., Македонова Ю.А., Адамович Е.И., Марымова Е.Б. Экспериментальное изучение динамики регенерации слизистой полости рта на фоне различных методов фармакотерапии. *Современные проблемы науки и образования*. 2018;46:15–20. [Porojskij S.V., Makedonova Yu.A., Adamovich E.I., Marymova E.B. Eksperimental'noe izuchenie dinamiki regeneratsii slizистой полости рта na fone razlichnyh metodov farmakoterapii [Experimental study of the dynamics of regeneration of the oral mucosa against the background of various methods of pharmacother-

- ару]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [The modern problems of science and education]. 2018;46:15–20. (In Russian)].
5. Рябова Д.А., Орлинская Н.Ю., Цыбусов С.Н., Хомутинникова Н.Е., Лапшин Р.Д., Дурново Е.А. Использование полимерной фосфолипидной матрицы для закрытия открытых ран на слизистой оболочке полости рта. *СТМ*. 2016;8(1):55–63. [Ryabova D.A., Orlinskaya N.Yu., Sybusov S.N., Homutinnikova N.E., Lapshin R.D., Durnovo E.A. Ispol'zovanie polimernoj fosfolipidnoj matricy dlya zakrytiya otkrytyh ran na slizistoj obolochke polosti rta [Use of a polymer phospholipid matrix to close open wounds on the oral mucosa]. *STM Journal*. 2016;8(1):55–63. (In Russian)]. DOI: 10.17691/stm2016.8.1.08.
 6. Шинкевич Д.С. Арутюнян С.Э., Афанасьев В.В. Применение мембран из силикона для лечения послеоперационных ран в преддверии полости рта. *Военно-медицинский журнал*. 2016;337(9):60–62. [Shinkevich D.S. Arutyunyan S.E., Afanas'ev V.V. Primenenie membran iz silikona dlya lecheniya posleoperacionnyh ran v preddverii polosti rta [The use of silicone membranes for the treatment of postoperative wounds of the oral cavity]. *Voенно-медицинский zhurnal* [Military and Medical Journal]. 2016;337(9):60–62. (In Russian)].
 7. Badaraev A.D., Bolbasov E.N., Stankevich K.S., Tverdokhlebov S.I., Koniaeva A., Krikova S.A., Varakuta E.Y., Shesterikov E.V., Nemoikina A.L., Bouznic V.M., Zhukov Y.M., Mishin I.P. Piezoelectric polymer membranes with thin antibacterial coating for the regeneration of oral mucosa. *Applied Surface Science*. 2020;504:144068. DOI: 10.1016/j.apsusc.2019.144068.
 8. Bolbasov E.N., Popkov A.V., Popkov D.A. Osteoinductive composite coatings for flexible intramedullary nails. *Mater. Sci. Eng. C*. 2017;75:207–220. DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.073.
 9. Des Jardins-Park H., Mascharak E.S., Chinta M.S., Wan D.C., Longaker M.T. The spectrum of scarring in craniofacial wound repair. *Frontiers in physiology*. 2019;10:322. DOI: 10.3389/fphys.2019.00322.
 10. Kim J.F., Lee Y.M., Drioli E. Thermally induced phase separation and electrospinning methods for emerging membrane applications: a review. *Advances in materials separations: materials, devices and processes*. 2016;62(2):461–490. DOI: 10.1002/aic.15076.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Коняева Анастасия Денисовна*, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: asyakonya95@gmail.com

Варакута Елена Юрьевна, д.м.н., ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: varelen@rambler.ru

Лейман Арина Евгеньевна, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: ariha1998@icloud.com

Anastasiia D. Koniaeva*, Siberian State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: asyakonya95@gmail.com

Elena Yu. Varakuta, Dr. Sci. (Med.), Siberian State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: varelen@rambler.ru

Arina E. Leuman, Siberian State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: ariha1998@icloud.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ВИДОВ ТОКСИЧНОСТИ КАНДИДАТНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА К НЕОДЕТЕРМИНАНТЕ С3 КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТРАВМАТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

К.А. Некрасова*, А.В. Трофимов, А.В. Жахов, С.В. Родин, Н.П. Горбунов, А.В. Петров, Н.В. Пигарева, Г.В. Александров, М.С. Захаров, А.С. Кирьянова, О.Э. Хуттунен, И.В. Бендт, А.Э. Крылова, А.М. Ищенко

*ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
ФМБА России*

197110, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7

Целью данной работы являлись доклинические исследования специфических видов токсичности, а именно аллергенности, иммунотоксичности и репродуктивной токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека. В реакциях общей анафилаксии, активной кожной анафилаксии и реакции ГЗТ показано, что препарат не сенсибилизирует экспериментальных животных и не вызывает гиперчувствительности немедленного или замедленного типа. Препарат в дозах, многократно превышающих предполагаемую человеческую терапевтическую дозу, не оказывает негативного воздействия на развитие гуморального и клеточного иммунного ответа, а также не подавляет фагоцитарную функцию фагоцитов, что говорит об отсутствии у него иммунотоксического действия. Препарат не оказывает негативного воздействия на генеративную функцию самцов и самок, а также не вызывает нарушений эмбрионального развития у потомства, полученного от скрещивания данных животных, и не оказывает достоверного воздействия на пренатальное и постнатальное развитие потомства. Результаты проведенной работы могут быть использованы при изучении клинической безопасности кандидатного лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека для лечения травматических повреждений головного мозга.

Ключевые слова: рекомбинантное антитело, С3 компонент комплемента, доклинические исследования, аллергенность, иммунотоксичность, репродуктивная токсичность

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансовая поддержка: исследование выполнено по Государственному контракту № 14.N08.11.0121 от 30 сентября 2016 г. «Доклинические исследования лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к С3 компоненту комплемента человека для лечения травматического повреждения головного мозга» в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Для цитирования: Некрасова К.А., Трофимов А.В., Жахов А.В., Родин С.В., Горбунов Н.П., Петров А.В., Пигарева Н.В., Александров Г.В., Захаров М.С., Кирьянова А.С., Хуттунен О.Э., Бендт И.В., Крылова А.Э., Ищенко А.М. Доклинические исследования специфических видов токсичности кандидатного лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека для лечения травматических повреждений головного мозга. *Биомедицина*. 2021;17(4):68–80. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-68-80>

Поступила 16.03.2021

Принята после доработки 08.07.2021

Опубликована 10.12.2021

PRECLINICAL STUDIES INTO SPECIFIC TOXICITY OF A CANDIDATE DRUG BASED ON COMPLEMENT C3 NEODETERMINANT RECOMBINANT HUMANIZED ANTIBODY FOR TREATING TRAUMATIC BRAIN INJURIES

Kseniya A. Nekrasova*, Alexandr V. Trofimov, Alexandr V. Zhahov, Sergey V. Rodin, Nikolay P. Gorbunov, Alexandr V. Petrov, Nataliya V. Pigareva, Georgiy V. Alexandrov, Mikhail S. Zakharov, Anna S. Kiryanova, Olga E. Khuttunen, Irina V. Bendt, Anna E. Krylova, Alexandr M. Ischenko

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
197110, Russian Federation, Saint Petersburg, Pudozsкая Str., 7

This study aims to assess the specific toxicity (allergenicity, immunotoxicity and reproduction toxicity) of a dosage form of complement C3 neodeterminant recombinant humanized antibody. The reactions of general anaphylaxis, active cutaneous anaphylaxis and delayed-type reaction demonstrated no drug-related signs of experimental animal sensitization and immediate or delayed hypersensitivity in the treated animals. It was found that, in doses exceeding significantly the expected human therapeutic dose, the drug has no effect on humoral and cell-mediated immune responses. In addition, the drug does not suppress the phagocytic cell activity thereby indicating the absence of immunotoxic effect. Moreover, the drug has no adverse effects on male and female reproduction, progeny embryonal development, as well as prenatal and postnatal progeny development. The obtained data can be used in future clinical studies of the drug safety.

Keywords: recombinant antibody, C3 component of the complement, preclinical studies, allergenicity, immunotoxicity, reproduction toxicity

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

Funding: the study was carried out under State contract No. 14.N08.11.0121 dated September 30, 2016 “Preclinical studies of a drug based on a recombinant humanized antibody to the C3 component of human complement for the treatment of traumatic brain injury” within the framework of the Federal target program “Development of pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond”.

For citation: Nekrasova K.A., Trofimov A.V., Zhahov A.V., Rodin S.V., Gorbunov N.P., Petrov A.V., Pigareva N.V., Alexandrov G.V., Zakharov M.S., Kiryanova A.S., Khuttunen O.E., Bendt I.V., Krylova A.E., Ischenko A.M. Preclinical Studies into Specific Toxicity of a Candidate Drug Based on Complement C3 neodeterminant Recombinant Humanized Antibody for Treating Traumatic Brain Injuries. *Journal Biomed.* 2021;17(4):68–80. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-68-80>

Submitted 16.03.2021

Revised 08.07.2021

Published 10.12.2021

Введение

В рамках ранее проведенного доклинического изучения специфической фармакологической активности рекомбинантного гуманизированного антитела к недетерминанте С3 компонента комплемента человека на модели свободно падающего груза у крыс с использованием его аналога — моноклонального антитела, специфично-

го С3 компоненту комплемента крысы, было показано, что введение высокоаффинных моноклональных антител, блокирующих активацию комплемента крысы по альтернативному пути на стадиях формирования жидкофазной и твердофазной С3-конвертаз и предотвращающих образование С5-конвертазы, экспериментальным животным с черепно-мозговой травмой

приводило к выраженному положительно-му эффекту, проявлявшемуся в сохранении когнитивных функций животных, а также в улучшении гистологической картины мозговой ткани [1].

Целью настоящей работы являлись доклинические исследования специфических видов токсичности, а именно аллергенности, иммунотоксичности и репродуктивной токсичности лекарственной формы (ЛФ) рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека.

Материалы и методы

Реагенты и дозы,

животные и их содержание

В исследовании использовали лекарственную форму рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека hC34, представляющую собой лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения. Препарат изготавливают из субстанции рекомбинантного гуманизированного антитела hC34, которую получают биотехнологическим способом с использованием клеток-продуцентов СНО-humC34 [3]. Один флакон препарата содержит активный компонент — рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 100 мг; вспомогательные компоненты: натрия хлорид 18,8 мг, натрия дигидрофосфата дигидрат 6,64 мг, натрия гидрофосфата додекагидрат 2,68 мг, поли-

сорбат-800,2 мг, динатрия эдетат 0,36 мг, сахараза 20 мг. Предполагаемая среднесуточная терапевтическая доза препарата для человека составляет 2,3 мг/кг, и все дозировки лекарственного средства в данных исследованиях рассчитаны исходя из этой дозы и коэффициента экстраполяции доз с грызунов на человека в соответствии с руководством Т.А. Гуськовой [2].

Исследования проводили на белых беспородных мышах, мышах-гибридах F1 (СВА/lac×С57Bl/6), морских свинках, белых беспородных крысах, полученных из ФГУП «ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская обл.), обоого пола (табл. 1). Основные правила содержания и ухода соответствовали «Санитарно-эпидемиологическим требованиям к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденным постановлением Главного санитарного врача РФ от 29.08.2014 г., а также правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.). Объем работ и перечень процедур был одобрен биоэтической комиссией института. Доклинические исследования проводили на основе рекомендаций действующих методических документов [4, 5].

Изучение аллергенности

Реакцию общей анафилаксии (анафилактический шок) проводили на морских свинках, случайным образом разделенных на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа получала физ. р-р (ФР): первая инъекция подкожно (п/к), две последующие — внутримышечно (в/м) через день в область бедра. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг (минимально возможная доза для введения, среднесуточная терапевтическая доза для человека с учетом коэффициента пересчета 11,8) и 250 мг/кг (10-кратная терапевтическая доза), соответственно. Через 21 день после первого введения всем животным вну-

Таблица 1. Характеристика экспериментальных животных

Table 1. Characterization of experimental animals

Вид животных	Возраст, недели	Масса, г
Белые беспородные мыши	9–10	19–21
Морские свинки	5–6	200–250
Мыши-гибриды F1 (СВА/lac×С57Bl/6)	9–10	19–21
Белые беспородные крысы	9–10	180–200

трисердечно вводили разрешающую дозу ЛФ антитела hC34, которая составила суммарную сенсибилизирующую дозу для каждой группы соответственно. Животным контрольной группы вводили разрешающую дозу, используемую для опытной группы 2. Учет интенсивности анафилактического шока проводили в индексах по Weigle [7].

Реакцию активной кожной анафилаксии проводили на белых беспородных мышах, случайным образом разделенных на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа получала ФР: первая инъекция п/к, две последующие — в/м через день в область бедра. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, соответственно. Через 21 день после первой инъекции ЛФ антитела hC34 всем животным на выстриженных участках спины внутрикожно вводили препарат в двукратных разведениях в концентрациях, не вызывающих кожно-раздражающего действия. Через 20 мин после введения препарата всем животным вводили внутривенно (в/в) по 0,5 мл 1% р-ра красителя синего Эванса. Через 30 мин животных умерщвляли в CO₂-камере и определяли размеры синего пятна на внутренней стороне кожи в месте введения препарата (при положительной реакции диаметр пятна — не менее 6 мм). Для контроля реактивности кожи обязательно вводили тому же животному на другом выстриженном участке 0,05 мл стерильного изотонического р-ра натрия хлорида. Разрешающую инъекцию препарата и синего Эванса делали также животным контрольной группы. У таких животных в месте внутрикожного введения препарата диаметр окрашенного пятна не должен превышать 2–3 мм.

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) проводили на мышах-гибридах F1 (CBA/лс×C57Bl/6), разделенных на 2 равные группы (по 10 самок

и 10 самцов). Контрольной группе ежедневно в течение 7-ми дней в/в вводили ФР, опытной группе по той же схеме вводили изучаемую ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг (20-кратная терапевтическая доза). Через 5 сут. после последней инъекции всем животным в подушечку одной задней лапы вводили 50 мкл ЛФ антитела hC34, в контралатеральную лапу вводили растворитель. Через 24 ч, после эвтаназии всех животных, обе лапы равнозначно отрезали выше пяточного сустава и взвешивали. Индекс реакции подсчитывали в процентах прироста массы лапы, в которую вводили препарат (P_о), по отношению к массе контрольной лапы (P_к) по формуле:

$$[(P_o - P_k) / P_k] \times 100.$$

Изучение иммунотоксичности

Для определения числа антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышигибриды F1 (CBA/лс×C57Bl/6) были разделены на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа ежедневно в течение 7 дней в/в получала ФР. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, соответственно. На 7-й день все мыши были иммунизированы внутрибрюшинной инъекцией эритроцитов барана (ЭБ) в субоптимальной дозе 5×10⁷ ЭБ на животное. Подсчет числа АОК в селезенке мышей проводили на 5-е сут. после иммунизации. Реакцию ставили на предметных стеклах без поддерживающей среды по Canningham [6]. По количеству зон гемолиза эритроцитов вокруг отдельных АОК, определяемых под микроскопом, подсчитывали число клеток — продуцентов антител — в расчете на 10⁶ спленоцитов.

Реакцию ГЗТ проводили на мышах-гибридах F1 (CBA×C57Bl6), разделенных на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа ежедневно, в течение 7-ми дней в/в получала ФР. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ

антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, соответственно. На 7-й день все мыши были сенсibilизированы однократно п/к введением в межлопаточную область 0,05 мл раствора, содержащего 2×10^5 ЭБ. Для выявления гиперчувствительности на 5-е сут. после сенсibilизации всем животным в подушечку задней лапы вводили 10^8 ЭБ в 0,05 мл изотонического р-ра хлорида натрия (разрешающая инъекция). В противоположную лапу вводили изотонический р-р хлорида натрия в том же объеме. Через 24 ч проводили оценку реакции и подсчитывали индекс, как описано выше.

Для оценки фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мыши-гибриды F1 (СВА/Лас \times C57Bl/6) были разделены на 3 равные группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа ежедневно в течение 7-ми дней в/в получала ФР. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, соответственно. На следующий день после последней инъекции препарата всех животных забивали и промывали брюшную полость культуральной средой. Ставили реакцию фагоцитоза с опсонизированными дрожжами на чашках Петри по стандартной методике. Чашки фиксировали и окрашивали по Романовскому—Гимзе. Под микроскопом подсчитывали процент фагоцитировавших макрофагов, нефагоцитировавших макрофагов, а также процент незавершенных фагоцитозов, кроме того, подсчитывали среднее количество фагоцитированных дрожжевых клеток.

Изучение репродуктивной токсичности

Исследования репродуктивной токсичности проводили на белых беспородных крысах. ЛФ антитела hC34 вводили самкам (n=20) ежедневно в/в в дозе 500 мг/кг (20-кратная терапевтическая доза) в течение 15 дней (3 эстральных цикла). Самцам (n=10) препарат вводили в/в в дозе 500 мг/кг в течение всего периода сперматогенеза (48 дней). В качестве контрольных

использовали аналогичные группы самок и самцов, которым по той же схеме вводили ФР. После завершения введения препарата самки были ссажены с самцами в соотношении 2 самки на 1-го самца на 2 эстральных цикла (10 дней). Самок опытной группы ссаживали с самцами опытной группы, самок контрольной группы — с самцами контрольной группы. Взвешивание животных проводили до начала эксперимента, после завершения введения препарата и перед эвтаназией. Забой и морфологическое исследование репродуктивной системы самок проводили на 20-й день после оплодотворения, при этом определяли индекс фертильности — отношение числа беременных самок к числу подсаженных, а также показатели пред- и постимплантационной гибели зародышей. Каждый плод был подвергнут внешнему осмотру и взвешиванию. Половину плодов из каждого помета фиксировали в смеси Буэна для последующего изучения внутренних органов по методу Вильсона [3]. Остальные плоды фиксировали в 96% спирте для изучения состояния костного скелета по модифицированному методу Даусона [3].

Исследование эмбриотоксического действия препарата проводили в 2 этапа. На первом этапе оценивали действие препарата в пренатальный период развития, на втором этапе изучали его возможное постнатальное действие. Спаривание интактных виргинных самок осуществляли с интактными самцами.

На первом этапе ЛФ антитела hC34 в/в вводили двум опытным группам самок (по 15 самок) с 1-го по 19-й день беременности: в 1-й группе — в дозе 24 мг/кг (предполагаемая терапевтическая доза для человека составляет 4 мг/кг, коэффициент пересчета на площадь поверхности тела 5,9), во 2-й группе — в дозе 500 мг/кг. В контрольной группе самкам (n=15) в эти же сроки вводили ФР. Вскрытие самок проводили после эвтана-

зии на 20-й день беременности, при этом определяли количество желтых тел в яичниках, подсчитывали количество мест имплантации, резорбции и живых плодов. Каждый плод подвергали внешнему осмотру и взвешиванию. Половину плодов из каждого помета фиксировали в смеси Буэна для последующего изучения внутренних органов по методу Вильсона. Остальные животные из каждого помета фиксировались в 96% спирте для изучения состояния костного скелета по модифицированному методу Даусона.

На втором этапе ЛФ антитела hC34 в/в вводили одной группе самок (n=15) в дозе 500 мг/кг с 1-го по 21-й день беременности, в контрольной группе самкам (n=15) в эти же сроки вводили ФР. После родов в каждом помете оставляли не более 8 крысят для дальнейшего изучения физического развития потомства, скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания, исследования эмоционально-двигательного поведения крысят после окончания периода вскармливания. При изучении физического развития потомства регистрировали размер помета, число живых и мертвых новорожденных, число особей разного пола, массу тела крысят на 4-й, 7-й, 14-й и 21-й дни после рождения, а также сроки отлипания ушной раковины, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов, открытия глаз, опускания семенников. Изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания проводили с использованием следующих тестов: переворачивание на плоскости (2–4 дни), отрицательный геотаксис (5–6 дни), избегание обрыва (4–6 дни). Опыты проводили 1 раз в день в одно и то же время до полного формирования рефлексов по указанным тестам. В возрасте 30 дней у потомства изучали эмоционально-двигательное поведение с использованием теста «Открытое поле».

Статистическая обработка

Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel-2007 (Microsoft Corporation). Результаты представляли в виде средних значений и ошибок среднего ($M \pm m$). Сравнение показателей между группами при изучении аллергенности и иммунотоксичности проводили однофакторным дисперсионным анализом (one-way ANOVA) при наличии или отсутствии нормального распределения по Крускал—Уоллес (непараметрический тест). Сравнение показателей между группами при изучении репродуктивной токсичности проводили с помощью непарного Т-критерия Стьюдента с неравными отклонениями, а также по U-критерию Манна—Уитни. Отличия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Изучение аллергизирующего действия

При оценке реакции гиперчувствительности немедленного типа (анафилактическая реакция) у морских свинок в опытных группах, сенсibilизированных введением ЛФ антитела hC34, не было выявлено никаких проявлений анафилактического шока. Индексы по Weigle у морских свинок после сенсibilизации препаратом в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, а также в контрольной группе были равны нулю.

При оценке реакции активной кожной анафилаксии результаты измерения диаметров цветных пятен, образовавшихся на месте введения разрешающей дозы ЛФ антитела hC34, показали, что размеры пятен составили от 1 до 2 мм (табл. 2).

Поскольку ни у одного животного размер пятна не превысил 3 мм, на основании полученных данных можно заключить, что у животных, сенсibilизированных введением ЛФ антитела hC34 в дозах 25 мг/кг и 250 мг/кг, не наблюдали развития активной кожной анафилаксии.

Таблица 2. Оценка реакции активной кожной анафилактики у мышей после сенсibilизации ЛФ антитела hC34
Table 2. Evaluation of the active cutaneous anaphylaxis reaction in hC34 antibody-challenged mice

Экспериментальные группы	Пол	Номера животных				
		1	2	3	4	5
Контроль	Самцы	2	1	1	1	1
	Самки	2	2	2	2	2
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	Самцы	1	2	1	2	2
	Самки	1	1	1	1	1
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	Самцы	2	2	1	2	2
	Самки	1	1	2	1	2

Таблица 3. Оценка реакции гиперчувствительности замедленного типа у самцов мышей-гибридов F1 (CBA/лac×C57Bl/6) после сенсibilизации ЛФ антитела hC34

Table 3. Evaluation of the delayed hypersensitivity reaction in hC34 antibody-challenged F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (male)

Экспериментальные группы	Индекс реакции, %
Контроль	5,0±1,1
ЛФ антитела hC34	5,1±1,2

Таблица 4. Оценка реакции гиперчувствительности замедленного типа у самок мышей-гибридов F1 (CBA/лac×C57Bl/6) после сенсibilизации ЛФ антитела hC34

Table 4. Evaluation of the delayed hypersensitivity reaction in hC34 antibody-challenged F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (female)

Экспериментальные группы	Индекс реакции, %
Контроль	5,1±1,0
ЛФ антитела hC34	5,2±1,3

Результаты оценки реакции ГЗТ у мышей после сенсibilизации введением ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг представлены в табл. 3–4. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил статистически значимых отличий между группами в отношении индекса массы лапы мышей-гибридов, самцов и самок, после сенсibilизации ЛФ антитела hC34 (при $p=0,05$), что говорит об отсутствии реакции ГЗТ в ответ на введение ЛФ.

Исследование иммунотоксичности

Результаты определения числа АОК, образующихся в селезенке мышей в ответ на ЭБ после введения ЛФ антитела hC34 в дозах 25 и 250 мг/кг в течение 7-ми дней, представлены в табл. 5–6. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил статистически значимых отличий между группами в отношении числа АОК в селезенке мышей-гибридов F1 (CBA×C57Bl/6), самцов и самок, при введении ЛФ антитела hC34 (при $p=0,05$). Таким образом, показано, что изученные дозы ЛФ

антитела hC34 не оказывали негативного воздействия на развитие гуморального иммунного ответа.

Результаты оценки реакции ГЗТ у мышей после введения ЛФ антитела hC34 в дозах 25 и 250 мг/кг в течение 7-ми дней представлены в табл. 7–8. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил статистически значимых отличий между группами в отношении индекса массы лапы у мышей-гибридов F1 (CBA/лac×C57Bl/6), самцов и самок, при введении ЛФ антитела hC34 (при $p=0,05$). Выраженная реакция ГЗТ развивалась во всех экспериментальных группах. Показано, что изученные дозы препарата не оказывают значимого угнетающего воздействия на развитие клеточного иммунного ответа.

Результаты оценки фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов при введении ЛФ антитела hC34 в дозах 25 и 250 мг/кг в течение 7-ми дней мышам представлены в табл. 9–10. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил статисти-

Таблица 5. Оценка числа АОК в селезенке самцов мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6) при введении ЛФ антитела hC34

Table 5. Amount of antibody-forming cells in spleen of F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (male) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Количество антителообразующих клеток (на 10 ⁶ спленоцитов), M±m
Контроль	40,6±3,9
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	41,0±4,2
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	41,2±4,1

Таблица 6. Оценка числа АОК в селезенке самок мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6) при введении ЛФ антитела hC34

Table 6. Amount of antibody-forming cells in spleen of F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (female) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Количество антителообразующих клеток (на 10 ⁶ спленоцитов), M±m
Контроль	33,6±3,1
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	33,4±3,5
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	34,0±3,8

Таблица 7. Оценка развития гиперчувствительности замедленного типа у самцов мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6) при введении ЛФ антитела hC34

Table 7. Evaluation of the delayed hypersensitivity reaction in F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (male) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Индекс реакции, %
Контроль	54,4±2,4
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	54,6±2,7
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	54,6±2,5

Таблица 8. Оценка развития гиперчувствительности замедленного типа у самок мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6) при введении ЛФ антитела hC34

Table 8. Evaluation of the delayed hypersensitivity reaction in F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (female) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Индекс реакции, %
Контроль	56,2±2,4
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	56,8±2,3
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	56,4±2,8

чески значимых отличий между группами в отношении фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов при введении ЛФ антитела hC34 мышам-гибридам F1 (CBA/lac×C57Bl/6), самцам и самкам (при $p=0,05$). Показано, что изученные дозы препарата не оказывают угнетающего воздействия на фагоцитарную активность макрофагов.

Изучение репродуктивной токсичности

Результаты изучения генеративной функции экспериментальных животных показали, что при введении ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг ни в одной из изуча-

емых групп самцов или самок крыс не наблюдали снижения темпов прироста массы тела, изменений в поведении, гибели животных. Не выявлено никаких патологических изменений в репродуктивной системе самок и состоянии плодов (табл. 11).

Эмбриотоксическое действие препарата изучали в два этапа. На первом этапе проводили оценку возможного действия ЛФ антитела hC34 в пренатальный период развития. При введении ЛФ антитела hC34 в течение 19-ти дней самкам в дозах 24 мг/кг и 500 мг/кг никаких патологических сдвигов в репродуктивной системе

Таблица 9. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов при введении ЛФ антитела hC34 самцам мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6)

Table 9. Phagocytic activities of peritoneal macrophages in F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (male) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Фагоцитировавшие МФ (ФИ, %)	Число фагоцитированных дрожжей (ФЧ, у. е.)
Контроль	72±2,4	14±1,0
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	71±2,6	13±1,2
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	73±2,2	15±1,4

Таблица 10. Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов при введении ЛФ антитела hC34 самкам мышей-гибридов F1 (CBA/lac×C57Bl/6)

Table 10. Phagocytic activities of peritoneal macrophages in F1 (CBA/lac×C57Bl/6) mice (female) immunized by hC34 antibody

Экспериментальные группы	Фагоцитировавшие МФ (ФИ, %)	Число фагоцитированных дрожжей (ФЧ, у. е.)
Контроль	73±2,1	15±1,4
ЛФ антитела hC34, 25 мг/кг	74±2,5	14±1,4
ЛФ антитела hC34, 250 мг/кг	73±2,6	14±1,2

Таблица 11. Оценка влияния ЛФ антитела hC34 на репродуктивную систему самок и состояние плодов

Table 11. Assessment of hC34 antibody effect on female mice reproduction and embryonal development

Показатель/ Группа животных	Контроль	ЛФ антитела hC34, 500 мг/кг
Кол-во беременных самок	19	19
Индекс фертильности	95 %	95 %
Кол-во желтых тел, всего/ %	177/9,3±0,3	178/9,4±0,3
Кол-во мест имплантации, всего/ %	176/9,3±0,3	177/9,3±0,4
Кол-во живых плодов, всего/ %	171/9,0±0,3	172/9,1±0,3
Кол-во резорбций, всего/ %	5/0,26±0,13	5/0,26±0,13
Предимплантационная гибель	0,66±0,66	0,66±0,66
Постимплантационная гибель	2,91±1,50	2,54±1,22
Масса плодов	3,18±0,03	3,15±0,02
Краниокаудальный размер, мм	34,14±0,09	34,15±0,09
Внешний осмотр плодов		
Кол-во обследованных плодов	171	172
Из них с аномалиями, всего/ %	0/0	0/0
Состояние внутренних органов		
Кол-во обследованных плодов	85	86
Из них с аномалиями развития, всего/ %	0/0	0/0
Состояние костного скелета		
Кол-во обследованных плодов	86	86
Из них с аномалиями развития, всего/ %	0/0	0/0
Число центров оссификации метакарпальных костей	справа	3,50±0,05
	слева	3,56±0,05
Число центров оссификации метатарзальных костей	справа	3,44±0,05
	слева	3,51±0,05

самок и состоянии плодов обнаружено не было.

На втором этапе изучали возможное постнатальное действие препарата. При введении ЛФ антитела hC34 с 1-го по 21-й день беременности самкам в дозе 500 мг/кг никаких патологических сдвигов в развитии потомства не было обнаружено. Изучение физического развития потомства, скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания, эмоционально-двигательного поведения крысят после окончания периода вскармливания не выявило различий между контрольными и опытными группами животных (табл. 12–14).

Обсуждение результатов

Изучение аллергизирующего действия лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 в реакциях общей анафилаксии, активной кожной анафилаксии и реакции ГЗТ показало, что в проведенных экспериментах препарат не сенсibiliзирует экспериментальных животных и не вызывает гиперчувствительности немедленного или замедленного типа.

Изучение развития иммунного ответа после введения лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 показало, что препарат в дозах, многократно превышающих предполагаемую человеческую терапевтическую дозу,

Таблица 12. Показатели физического развития потомства самок крыс, получавших ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг

Table 12. Physical development of female rat progeny after treatment with hC34 antibody at a dose of 500 mg/kg

Показатели	Группа животных	
	Контроль	ЛФ антитела hC34, 500 мг/кг
Кол-во пометов	15	15
Кол-во крысят, всего/ср. в помете	162/10,8±0,4	162/10,8±0,4
В т.ч. живых, всего/ср. в помете	158/10,5±0,4	157/10,5±0,4
Погибло в период вскармливания, всего/ср. в помете	2/0,13±0,09	2/0,13±0,9
Кол-во самцов	83	86
Кол-во самок	75	71
День отлипания ушной раковины	2,98±0,06	2,99±0,06
День появления первичного волосяного покрова	4,69±0,10	4,63±0,09
День прорезывания резцов	8,39±0,10	8,36±0,07
День открытия глаз	14,6±0,1	14,6±0,1
День опускания семенников	28,9±0,3	29,0±0,4
Масса тела крысят, г		
4-й день	7,63±0,09	7,70±0,09
7-й день	14,7±0,1	14,7±0,1
14-й день	36,9±0,2	37,0±0,3
21-й день	57,8±0,3	57,9±0,4

Таблица 13. Показатели скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов потомства самок, получавших ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг

Table 13. The rate of maturation of sensory-motor reflexes in female offspring after treatment with hC34 antibody at a dose of 500 mg/kg

Показатели	Группа животных	
	Контроль	ЛФ антитела hC34, 500 мг/кг
Переворачивание на плоскости, ср. знач.	7,14±0,03	7,19±0,04
Отрицательный геотаксис, ср. знач.	6,30±0,04	6,08±0,06
Избегание обрыва, ср. знач.	8,22±0,05	8,28±0,05

Таблица 14. Показатели исследования эмоционально-двигательного поведения потомства самок, получавших ЛФ антитела hC34 в дозе 500 мг/кг

Table 14. Emotional and motor behavior in female offspring after treatment with hC34 antibody at a dose of 500 mg/kg

Показатели	Группа животных	
	Контроль	ЛФ антитела hC34, 500 мг/кг
Возраст 30 дней		
Время отсутствия активности, с	1,2±0,1	1,0±0,1
Число пересеченных секторов	34,5±0,3	34,7±0,5
Число вертикальных стоек	12,4±0,4	12,7±0,3
Заглядывания в отверстия	2,1±0,1	2,3±0,1
Акты урикации	1,3±0,1	1,4±0,1
Акты дефекации	1,6±0,1	1,7±0,1

не оказывает негативного воздействия на развитие гуморального и клеточного иммунного ответа, а также не подавляет фагоцитарную функцию фагоцитов, что говорит об отсутствии у него иммунотоксического действия в использованных экспериментальных моделях.

Изучение генеративной функции экспериментальных животных, получавших в течение гаметогенеза лекарственную форму рекомбинантного гуманизированного антитела hC34, показало, что препарат в дозе 500 мг/кг (в 125 раз превосходящей терапевтическую дозу для человека) не оказывает негативного воздействия на генеративную функцию самцов и самок, а также не вызывает нарушений эмбрионального развития у потомства, полученного от скрещивания данных животных.

Изучение эмбриотоксического действия лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34

показало, что изученный препарат в дозах до 500 мг/кг не оказывает достоверного воздействия на пренатальное и постнатальное развитие потомства.

Выводы

В результате доклинических исследований аллергенности, иммунотоксичности и репродуктивной токсичности лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека показано, что препарат не обладает специфическими видами токсичности. Результаты, полученные в данном исследовании, могут быть использованы при изучении клинической безопасности кандидатного лекарственного средства на основе рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека для лечения травматических повреждений головного мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Горбунов Н.П., Ищенко А.М., Жахов А.В., Трофимов А.В., Денисенко Е.С., Александров Г.В., Захаров М.С. Изучение ингибирующего действия анти С3 антител на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Российский иммунологический журнал*. 2018;12(4):641–643. DOI:10.31857/S102872210002623-0 [Gorbunov N.P., Ishchenko A.M., Zhakhov A.V., Trofimov A.V., Denisenko E.S., Aleksandrov G.V., Zakharov M.S. Izuchenie ingibiruyushchego deystviya anti S3 antitel na modeli cherepno-mozgovoy travmy u kryс [Study of the inhibitory effect of anti-C3 antibodies in a model of traumatic brain injury in rats]. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal [Russian journal of immunology]*. 2018;12(4):641–643. (In Russian)].
2. Гуськова Т.А. *Токсикология лекарственных средств*. М.: Русский врач, 2003:154. [Gus'kova T.A. *Toksikologiya lekarstvennykh sredstv [Drug toxicology]*. Moscow: Russkiy vrach Publ., 2003:154. (In Russian)].
3. Картузова В.Е., Трофимов А.В., Ищенко А.М., Родин С.В., Жахов А.В., Симбирцев А.С., Климов Н.А., Петров А.В., Карасев М.М. *Гуманизированное антитело к конформационному эпитопу С3 компонента комплемента человека, последовательность ДНК (варианты)*,

- экспрессионный вектор, содержащий последовательность ДНК (варианты), и штамм клеток яичников китайского хомячка CHO-humC34 — продуцент данного гуманизированного антитела. Патент РФ № 2630647, 27.05.2016. [Kartuzova V.E., Trofimov A.V., Ishchenko A.M., Rodin S.V., Zhakhov A.V., Simbirtsev A.S., Klimov N.A., Petrov A.V., Karasev M.M. *Gumanizirovannoe antitelo k konformatsionnomu epitopu S3 komponenta komplekta cheloveka, posledovatel'nost' DNK (varianty), ekspressionnyy vektor, sodержashchiy posledovatel'nost' DNK (varianty), i shtamm kletok yaichnikov kitayskogo khomyachka CHO-humC34 — produkt dannogo gumanizirovannogo antitela* [Humanized antibody to the conformational epitope C3 of the human complement component, DNA sequence (variants), expression vector containing the DNA sequence (variants), and the Chinese hamster ovary cell strain CHO-humC34 — the producer of this humanized antibody]. Patent RF No. 2630647, 27.05.2016. (In Russian)].
4. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.* Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2013:944. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Ed. A.N. Mironov. Part one]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2013:944. (In Russian)].
5. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть вторая. Иммунобиологические лекарственные препараты.* Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012:536. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' vtoraya. Immunobiologicheskie lekarstvennye preparaty [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part two. Immunobiological drugs]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012:536. (In Russian)].
6. Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. *Nature*. 1965;207(5001):1106–1107.
7. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit. *J. Immunol*. 1960;85:469.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Некрасова Ксения Александровна*, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: k.a.nekrasova@hpb.spb.ru

Трофимов Александр Викторович, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

Жахов Александр Владимирович, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: a.v.zachov@hpb.spb.ru

Родин Сергей Владимирович, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: s.v.rodin@hpb.spb.ru

Горбунов Николай Петрович, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: n.p.gorbynov@hpb.spb.ru

Kseniya A. Nekrasova*, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: k.a.nekrasova@hpb.spb.ru

Alexandr V. Trofimov, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: a.v.trofimov@hpb.spb.ru

Alexandr V. Zhahov, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: a.v.zachov@hpb.spb.ru

Sergey V. Rodin, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: s.v.rodin@hpb.spb.ru

Niklay P. Gorbunov, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: n.p.gorbynov@hpb.spb.ru

Петров Александр Владимирович, к.м.н., ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: atary@mail.ru

Пигарева Наталья Васильевна, к.м.н., ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: n.v.pigareva@hpb.spb.ru

Александров Георгий Вячеславович, к.б.н., ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: labr4@mail.ru

Захаров Михаил Сергеевич, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: m.s.zakharov@hpb.spb.ru

Кирьянова Анна Сергеевна, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: a.s.kirianova@hpb.spb.ru

Хуттунен Ольга Эрнестовна, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: o.e.khuttunen@hpb.spb.ru

Бендт Ирина Владимировна, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: i.v.bendt@hpb.spb.ru

Крылова Анна Эдуардовна, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: a.e.krylova@hpb.spb.ru

Ищенко Александр Митрофанович, к.б.н., ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;
e-mail: a.m.ischenko@hpb.spb.ru

Alexandr V. Petrov, Cand. Sci. (Med.), State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: atary@mail.ru

Nataliya V. Pigareva, Cand. Sci. (Med.), State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: n.v.pigareva@hpb.spb.ru

Georgiy V. Alexandrov, Cand. Sci. (Biol.), State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: labr4@mail.ru

Mikhail S. Zakharov, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m.s.zakharov@hpb.spb.ru

Anna S. Kiryanova, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: a.s.kirianova@hpb.spb.ru

Olga E. Khuttunen, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: o.e.khuttunen@hpb.spb.ru

Irina V. Bendt, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: i.v.bendt@hpb.spb.ru

Anna E. Krylova, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: a.e.krylova@hpb.spb.ru

Alexandr M. Ischenko, Cand. Sci. (Biol.), State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: a.m.ischenko@hpb.spb.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Лабораторкорм

Более десяти лет коллектив нашей организации обеспечивает высококачественным комбикормом для лабораторных животных научные медицинские и учебные учреждения России.

Реализуем:

- ✓ Оборудование для вивариев (клетки-стеллажи и др.);
- ✓ Подстилочный материал из древесной стружки;
- ✓ Зерно: пшеница, овес, ячмень,
- ✓ Премиксы.



НАШИ КОРМА
полнорационные,
сбалансированные по
аминокислотному составу,
минералам и витаминам

Доставка в любой регион России

Наш адрес: Москва, 2-й Вязовский проезд, д. 16, стр. 10

ООО «Лабораторкорм»

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 220-01-23

www.laboratorkorm.ru

Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России

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

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

Филиал «Столбовая» предлагает следующих животных:

I. Инбредные мыши линий:

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

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

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

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

II. Трансгенные мыши линий:

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

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

III. Межлинейные гибриды мышей:

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

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

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

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

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

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

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



142350, Московская обл., Чеховский р-н, п. Столбовая, ул. Мира, д. 1 а
Тел.: 8 (495)996-59-52; 8 (496)726-95-15

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

E-mail: biomaus@mail.ru

