

2
2019

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2074-5982 (print)

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 15
2019

2

НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ФОМБА РОССИИ



Коллектив Научного центра биомедицинских технологий
ФМБА России сердечно поздравляет директора
НЦБМТ ФМБА России, заместителя главного редактора
журнала «Биомедицина» доктора медицинских наук,
профессора **КАРКИЩЕНКО Владислава Николаевича**
с награждением медалью ордена
«За заслуги перед Отечеством» I степени.



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2019, Том 15, № 2

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

JOURNAL BIOMED

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.
Quarterly.

2019, Vol. 15, No. 2

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

Научный журнал «Биомедицина» основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий Российской академии медицинских наук (в настоящее время — ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»). Журнал издается на русском и английском языках. В журнале публикуются исследования по новым биомедицинским технологиям, спортивной медицине, новым регуляторным пептидам, спортивному питанию, лабораторным животным, методам биомедицинских исследований, генетике лабораторных животных, фармакологии и клинической фармакологии, восстановительной и спортивной медицине, лечебной физкультуре. Журнал предназначен для ученых, аспирантов, преподавателей и студентов вузов, специалистов, работающих в области биологии, ветеринарии, медицины и биомедицины. В журнале опубликованы статьи авторов из 119 различных организаций (медицинских и биологических вузов, НИИ, центров повышения квалификации специалистов), география организаций включает в себя Москву, Санкт-Петербург, Астрахань, Урал, Саратов, Кабардино-Балкарию, Томск, Дальний Восток, Нидерланды.

■ Главный редактор

Каркищенко Николай Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, академик Российской академии ракетных и артиллерийских наук, академик Международной академии астронавтики (Париж), научный руководитель ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

■ Заместитель главного редактора

Каркищенко Владислав Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

■ Ответственный секретарь

Станкова Наталия Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией спортивной медицины и экстремальных состояний, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

■ Редакционный совет

Анохин Константин Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, руководитель отдела нейронаук НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия)

Ачкасов Евгений Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой

спортивной медицины и медицинской реабилитации, ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Баранов Виктор Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заместитель генерального директора — директор НИИ космической медицины ФНЦ Федерального медико-биологического агентства (Москва, Россия)

Берзин Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, начальник Управления организации научных исследований Федерального медико-биологического агентства (Москва, Россия)

Быков Анатолий Тимофеевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заслуженный врач РФ, заведующий кафедрой восстановительной медицины, физиотерапии, мануальной терапии, ЛФК и спортивной медицины ФПК и ППС, «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Сочи, Россия)

Влахов Витан, доктор медицинских наук (Болгария), профессор, академик Болгарской академии наук и искусств, консультант по клинической фармакологии и терапии, Медицинский Университет (София, Болгария)

Воевода Михаил Иванович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал государственного бюджетного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (Новосибирск, Россия)

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

Гасанов Мелик Тофикович, кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора по научной работе, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (пос. Светлые горы, Красногорский район, Московская область, Россия)

Дыгай Александр Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки, заместитель академика-секретаря — руководитель секции медицинских наук РАН, директор, заведующий отделом патофизиологии и регенеративной медицины, ФГБУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (Томск, Россия)

Зефилов Андрей Львович, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заслуженный деятель науки Российской Федерации и Республики Татарстан, заведующий кафедрой нормальной физиологии, декан лечебного факультета ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Казань, Россия)

Кузденбаева Раиса Салмаганбетовна, доктор медицинских наук, профессор, академик Национальной академии наук Казахстана, член-корр. Академии медицинских наук Республики Казахстан и Академии профилактической медицины Республики Казахстан, начальник управления фармакологической экспертизы, «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники Минздрава Республики Казахстан (Астана, Казахстан)

Кукес Владимир Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Макляков Юрий Степанович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, Ростовский государственный медицинский университет (Ростов-на-Дону, Россия)

Матишов Геннадий Григорьевич, доктор географических наук, профессор, академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель Южного научного центра РАН, председатель Президиума ЮНЦ РАН (Ростов-на-Дону, Россия)

Мирошников Анатолий Иванович, доктор химических наук, академик РАН, председатель Пушинского научного центра РАН, заместитель директора, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН», председатель, «Пушинский научный центр РАН» (Москва, Россия)

Мурашёв Аркадий Николаевич, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора, руководитель лаборатории биологических испытаний, филиал ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН» (Пушино, Московская область, Россия)

Оковитый Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, ФГБУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Пчелинцев Сергей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, директор, ОАО «Институт инженерной иммунологии» (дер. Любучаны, Чеховский район, Московская область, Россия)

Раменская Галина Владиславовна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Решетов Игорь Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой онкологии, радиотерапии и пластической хирургии Института Профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Сычев Дмитрий Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, проректор по развитию и инновациям, заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии, ФГБОУ УД ПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» (Москва, Россия)

Хритинин Дмитрий Федорович, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, профессор кафедры психиатрии и наркологии ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

Цыганков Борис Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой психиатрии, наркологии и психотерапии ФПДО ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России (Москва, Россия)

Цысь Валентина Ивановна, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик РАН, профессор кафедры зоотехнии ФГБОУ ВО «Смоленская государственная сельскохозяйственная академия» (Смоленск, Россия)

Ших Евгения Валерьевна, доктор медицинских наук, профессор, директор института профес-

сионального образования, заведующая кафедрой клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, ФГАОУ ВО «Первый Московский медицинский государственный университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Шустов Евгений Борисович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГОУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, главный научный сотрудник, ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (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)
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
Стоимость одного выпуска:	400 руб.
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Учредитель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1
Издатель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1
Редакция:	143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1 Тел.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: scbmt@yandex.ru
Тираж:	3000 экземпляров
Типография:	ООО «БЕАН» 603003, Нижегородская обл, Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1

JOURNAL BIOMED

Scientific journal “Journal Biomed” was founded in 2005 by the Scientific Center for Biomedical Technology of the Russian Academy of Medical Sciences (now Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency). The magazine is published in Russian and English languages. The journal publishes research on new biomedical technologies, sports medicine, new regulatory peptides, sports nutrition, laboratory animals, methods of biomedical research, genetics laboratory animals, pharmacology and clinical pharmacology, rehabilitation and sports medicine, physical therapy. The journal is intended for scientists, graduate students, teachers and university students, professionals working in the field of biology, veterinary medicine and biomedicine. The magazine published articles by authors from 119 different organizations (medical and biological universities, research institutes, centers of advanced training), geography organizations includes Moscow, St. Petersburg, Astrakhan, Ural, Saratov, Kabardino-Balkaria, Tomsk, the Far East, the Netherlands.

■ Editor-in-Chief

Nikolay N. Karkischenko, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Academician of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Academician of the International Academy of astronautics (Paris), Academic Director of the Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

■ Deputy Editor-in-Chief

Vladislav N. Karkischenko, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

■ Executive Secretary

Natalia V. Stankova, Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Sports Medicine and Extreme States, Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

■ Editorial Council

Evgeniy E. Achkasov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Sports Medicine and Rehabilitation, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Konstantin V. Anokhin, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Neuroscience, Kurchatov Institute (Moscow, Russia)

Viktor M. Baranov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Deputy General Director — Director of the Research Institute of Space Medicine, Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia)

Igor A. Berzin, Doctor of Medical Sciences, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Head of the organization of scientific research Department, Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia)

Anatoliy T. Bykov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Rehabilitation Medicine, Physiotherapy, Manual Therapy, Physical Therapy and Sports Medicine of the Faculty of Advanced Training and Professional Retraining, Kuban State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sochi, Russia)

Aleksandr M. Dygay, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, the deputy Academician-secretary - the Head of section of medical sciences, Director, Head of the Department of Pathophysiology and Regenerative Medicine, E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (Tomsk, Russia)

Melik T. Gasanov, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Deputy Director for Science, Scientific Center for Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

JOURNAL BIOMED

Dmitriy F. Khritinin, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Department of Psychiatry and Addiction, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Vladimir G. Kukes, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of the Russian Federation, Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Raisa S. Kuzdenbayeva, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, Corresponding Member of the Academy of Medical Sciences of the Republic of Kazakhstan and of the Academy of Preventive Medicine of the Republic of Kazakhstan, Head of the Pharmacological Examination Department of the National Center for Expertise of Medicines, Medical Devices and Medical Equipment of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan (Astana, Kazakhstan)

Yuriy S. Maklyakov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation (Rostov-on-Don, Russia)

Gennadiy G. Matishov, Doctor of Geographical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Academic Director of the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Chairman of the Presidium of the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences (Rostov-on-Don, Russia)

Anatoliy I. Miroshnikov, Doctor of Chemical Sciences, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chairman of the Pushchino Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director of the Shemyakin — Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

Arkadiy N. Murashev, Doctor of Biological Sciences, Professor, Deputy Director, Head of the Laboratory of Biological Testing, Branch of the Shemyakin — Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (Pushchino, Moscow region, Russia)

Sergey V. Okovityi, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation (Saint Petersburg, Russia)

Sergey Yu. Pchelintsev, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director, Institute of Immunological Engineering (Lyubuchany, Chekhov District, Moscow Region, Russia)

Galina V. Ramenskaya, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Igor V. Reshetov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, the Head of the Department of oncology, radiotherapy and plastic surgery of the Institute of Professional Education, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Evgenia V. Shikh, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Institute of Vocational Education, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Evgeniy B. Shustov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Professor of pharmacology and clinical pharmacology Department, Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chief Scientist, Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency (Saint Petersburg, Russia)

Dmitriy A. Sychev, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Vice rector for Development and Innovations, Head of Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Russian Medical Academy of Postgraduate Education (Moscow, Russia)

Boris D. Tsygankov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Psychiatry, Psychotherapy and Addiction, A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (Moscow, Russia)

JOURNAL BIOMED

Valentina I. Tsys, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences, Professor of the Department of Animal Breeding, Smolensk State Agricultural Academy (Smolensk, Russia)

Vitan Vlahov, Doctor of Medical Sciences (Bulgaria), Professor, Academician of the Bulgarian Academy of Sciences and Arts, Consultant on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Medical University (Sofia, Bulgaria)

Mikhail I. Voevoda, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of

Sciences, Director, Research Institute of Therapy and Preventive Medicine — Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia)

Andrey L. Zefirov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of the Russian Federation and Republic of Tatarstan, Head of the Department of Normal Physiology, Kazan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Kazan, Russia)

JOURNAL BIOMED

Founded:	The journal has been published since 2005.
Frequency:	Quarterly
DOI Prefix:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print)
Mass media registration certificate:	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 от 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)
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, Settlement Svetlye Gory, building 1
Publisher:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Settlement Svetlye Gory, building 1
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Settlement Svetlye Gory, building 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: scbmt@yandex.ru
Circulation:	3000 copies
Printing house:	BEAN, LLC. 603003, Russian Federation, Nizhny Novgorod region, Nizhny Novgorod, Barrikad str., 1

■ НОВЫЕ БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов, С.Л. Люблинский, Н.Н. Каркищенко

Биологически активные компоненты экстрактов пантов пятнистого и благородного оленей пептидно-белковой природы 12

О.М. Лабынцева, О.А. Захарова, Ю.Е. Ананьева, Е.Г. Рохмистрова, Е.П. Лобкаева
Импульсное магнитное поле как средство повышения эффективности тренировочной нормобарической интервальной гипоксии у крыс 24

А.А. Мохов, А.А. Чапленко, А.Н. Яворский
Использование технологий геномного редактирования: достижения и перспективы . . . 34

И.А. Помыткин, Н.Н. Каркищенко
Метаболический контроль высокочастотных гамма-осцилляций в головном мозге 43

■ РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

М.С. Дуля, В.Н. Каркищенко, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов, Н.Н. Каркищенко
Цитокиновый профиль лабораторных инбредных и трансгенных мышей в оценке иммунологического статуса и поиске новых фармакологических регуляторов 54

А.В. Трофимов, А.Я. Рак, А.Г. Берзина, Л.И. Ульянова, Н.Б. Гамалея, Т.А. Климова, Н.В. Станкова
Антиидиотипические моноклональные антитела к морфину: получение, свойства и перспективы использования 63

■ МЕТОДЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович
Методы оценки неврологических нарушений при экспериментальной церебральной ишемии 69

А.И. Матюшкин, Е.А. Иванова, С.В. Алексеева, К.С. Качалов, Т.А. Воронина
Сравнение выраженности воспаления у крыс с первичной реакцией и вторичной иммунологической реакцией на инъекцию полного адьюванта Фрейнда 75

■ NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

- Vladislav N. Karkischenko, Maxim S. Dulya, Daniil V. Khvostov, Ruslan A. Ageldinov, Stanislav L. Lyublinskiy, Nikolay N. Karkischenko**
Biologically Active Components of Antlers Extracts (*Cervus Nippon*) and Red Deer (*Cervus Elaphus*) Peptide-Protein Nature 12
- Olga M. Labyntseva, Olga A. Zakharova, Juliya E. Ananieva, Elena G. Rokhmistrova, Yevgeniya P. Lobkayeva**
Pulsed Magnetic Field as a Means of Increasing the Efficiency of Normobaric Interval Hypoxia Training in Rats. 24
- Alexander A. Mokhov, Alexander A. Chaplenko, Alexander N. Yavorskiy**
Use of Genome Editing Technologies: Achievements and Future Prospects 34
- Igor A. Pomytkin, Nikolay N. Karkischenko**
Metabolic Control of High-Frequency Gamma Oscillations in the Brain. 43

■ RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

- Maxim S. Dulya, Vladislav N. Karkischenko, Daniil V. Khvostov, Ruslan A. Ageldinov, Nikolay N. Karkischenko**
Cytokine Profile of Laboratory Inbred and Transgenic Mice in the Evaluation of the Immunological Status and Search for New Pharmacological Regulators. 54
- Alexandr V. Trofimov, Alexandra Ya. Rak, Asya G. Berzina, Lyudmila I. Ulyanova, Natalia B. Gamaleya, Tatyana A. Klimova, Natalia V. Stankova**
Anti-Idiotypic Monoclonal Antibodies against Morphine: Production, Properties and Prospects of Use. 63

■ BIOMEDICAL METHODS

- Elizaveta I. Bon, Nataliya Ye. Maksimovich**
Methods for Estimating Neurological Disturbances in Experimental Cerebral Ischemia. 69
- Alexander I. Matyushkin, Elena A. Ivanova, Svetlana V. Alekseeva, Kirill S. Kachalov, Tatyana A. Voronina**
Comparison of the Severity of Inflammation in Rats with a Primary Reaction and Secondary Immunological Reaction to an Injection of Freund's Complete Adjuvant 75

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-12-23>

BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS OF ANTLERS EXTRACTS (*CERVUS NIPPON*) AND RED DEER (*CERVUS ELAPHUS*) PEPTIDE-PROTEIN NATURE

Vladislav N. Karkischenko, Maxim S. Dulya*, Daniil V. Khvostov, Ruslan A. Ageldinov, Stanislav L. Lyublinskiy, Nikolay N. Karkischenko

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Settlement Svetlye Gory, building 1

A complex study of the protein composition of the biologically active components of the extracts of the velvet deer antlers (VDA, include *Cervus nippon* and *Cervus elaphus*) using two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE), size-exclusion chromatography (SEC), and peptide mapping with high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (HPLC-MS) with the use of fermentation by trypsin was done. A molecular-mass distribution characteristic for protein extracts of VDA has been established. Optimal conditions for extraction, chromatographic separation and relative quantitative determination of the main components have been determined. The results of the identification of the most significant (major and minor) protein components in the extracts of the studied objects are described in detail in accordance with the algorithm of the search program Spectrum Mill MS Proteomics Workbench and the protein database Uniprot. The data of protein profiling are clustered according to molecular and biological functions. The connections of the identified proteins with possible mechanisms of biological action and targets, which can be affected by the protein components of the studied objects, are presented. Based on the results of the study, conclusions about the multicomponent protein composition of extracts of VDA were drawn. The marker protein components in the studied extracts are suggested and the possible interrelationships of the detected proteins in the extracts with biological effects are indicated.

Keywords: 2D-PAGE, HPLC-MS, IEF, peptide mapping, SEC, VDA

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

For citation: Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L., Karkischenko N.N. Biologically Active Components of Antlers Extracts (*Cervus Nippon*) and Red Deer (*Cervus Elaphus*) Peptide-Protein Nature. *Journal Biomed.* 2019;15(2):12–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-12-23>

Submitted 29.04.2019

Revised 27.05.2019

Published 10.06.2019

List of abbreviations: VDA — velvet deer antlers, 2D-PAGE — two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, SEC — size-exclusion chromatography, HPLC-MS — high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection, IEF — isoelectric focusing, RP — regulatory peptides, SDS-PAGE — sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, PPARGC1A — peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, Wnt — acronym from “Wingless/Integrated”, CNR1 — cannabinoid Receptor 1, PFL — pyruvate formate-lyase.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЭКСТРАКТОВ ПАНТОВ ПЯТНИСТОГО И БЛАГОРОДНОГО ОЛЕНЕЙ ПЕПТИДНО- БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ

В. Н. Каркищенко, М. С. Дуля*, Д. В. Хвостов, Р. А. Агельдинов,
С. Л. Люблинский, Н. Н. Каркищенко

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»

143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1

Проведены исследования белкового состава биологически активных компонентов экстрактов пантов пятнистого и благородного оленей (ППО и ПБО) методами двумерного гель-электрофореза (2D ПААГ), гель-размерной эксклюзионной хроматографии (ГРХ) и пептидным картированием методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) высокого разрешения с применением ферментативного расщепления трипсином. Установлено молекулярно-массовое распределение, характерное для белковых экстрактов ППО. Найдены оптимальные условия экстракции, хроматографического разделения и относительного количественного определения главных компонентов. Подробно представлены результаты идентификации наиболее значимых (мажорных и минорных) белковых компонентов в экстрактах изучаемых объектов в соответствии с алгоритмом поисковой программы Spectrum Mill MS Proteomics Workbench и белковой базой данных Uniprot. Данные белкового профилирования кластеризованы по молекулярным и биологическим функциям. Отображены связи идентифицированных белков с возможными механизмами биологического действия и мишенями, на которые могут оказывать воздействие белковые компоненты изучаемых объектов. По результатам исследования сделаны выводы о многокомпонентности белкового состава экстрактов ППО, содержащие перспективные для более детального изучения компоненты. Предложены маркерные белковые компоненты в составе изучаемых экстрактов и указаны возможные взаимосвязи обнаруженных белков в составе экстрактов с биологическими эффектами.

Ключевые слова: 2D ПААГ, ВЭЖХ-МС, ГРХ, ИЭФ, пептидное картирование, ППО

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В. Н., Дуля М. С., Хвостов Д. В., Агельдинов Р. А., Люблинский С. Л., Каркищенко Н. Н. Биологически активные компоненты экстрактов пантов пятнистого и благородного оленей пептидно-белковой природы. *Биомедицина*. 2019;15(2):12–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-12-23>

Поступила 29.04.2019

Принята после доработки 27.05.2019

Опубликована 10.06.2019

Список сокращений: ППО — панты пятнистого оленя, 2D ПААГ — двумерный гель-электрофорез, ГРХ — гель-размерная эксклюзионная хроматография, ВЭЖХ-МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, ИЭФ — изоэлектрическая фокусировка, РП — регуляторные пептиды, SDS-PAGE — электрофорез белков в полиакриламидном геле, PPARGC1A — рецептор пероксисом, активируемый пролифератором гамма-коактиватор 1-альфа, Wnt — акроним от «Wingless/Integrated», CNR1 — рецептор каннабиноидов 1-го типа, PFL — пируват формат лиаза.

Introduction

VDA is a part of the body, shaped like horns, but consisting of spongy cartilaginous tissue of *Cervus Nippon*. They are penetrated by a large number of blood vessels and have an intensive blood supply. When antlers reach the size of normal horns (on the 120–150th day from the beginning of growth), the process of their ossification begins. It is believed that during this period they are most biologically significant. Blood taken from a vein of an animal at the time of cutting also has activity similar to VDA. The expressed therapeutic properties of VDA are justified by the fact that during the growth of the horns of a young deer, his body actually produces up to 25 kg of bone tissue. Such growth rates are characteristic only for this family. This process requires strong support from all functional systems of the body and high concentrations of substances of a regulatory and protective nature, accordingly.

The use of drugs based on VDA and their blood in traditional medicine has more than two thousand years' history and is known in the past among many nations of the world. However, it is most widely spread as a branch of traditional medicine, and as a culture of maintaining a healthy lifestyle in China, the countries of Southeast Asia, Tibet and, to a lesser extent, among the peoples of southern Siberia and the Far North. At the beginning of XII, in China, for the first time, deer began to be domesticated in order to obtain VDA and their blood for the preparation of medicines [3].

It is known that medical preparations containing VDA products in their composition include a large number of substances of a regulatory nature: kinins, amino acids, phospholipids, growth factors involved in maintaining the activity and stability of the processes of anabolism and catabolism in the body, regulating the processes of inflammation, regeneration and immunity. The main functional difference between VDA and plant adaptogens is that the latter increase the body's resistance, limiting the harmful effects of external factors, while

the first drugs increase the capacity of the body's own resistance [3].

Structural and functional information about peptides of plant and animal origin is important for system biology. It can also be used in various application areas: in agriculture, in the manufacture of dietary products, pharmaceuticals, functional foods [1, 6].

The relevance of research

Modern tools of peptidomics and proteomics in biomedical research are aimed at analyzing and developing new active substances, drugs, searching for indicator peptides or proteins and their identification, as well as developing algorithms for identifying and subsequently using effective combinations of various substances of protein-peptide nature for the diagnosis, effective therapies and their use as functional foods [1, 6].

It is paradoxical that, despite the long period of use of extracts and by-products from the tissues of deer-like animals, the composition of their active components remains poorly understood, components associated with a wide spectrum of biological activity of the studied tissues are not reliably identified.

It is known that the composition of extracts from VDA includes fatty acids, waxes, aromatic and steroid compounds, cholesterol esters, as well as micro and macronutrients, free amino acids, oligo and polysaccharides, derivatives of the uracil series, the xanthine group.

Within the framework of the research cycle, the authors' special attention is attracted by the peptide-protein composition of the tissues under the study. Many types of biological activity of a substance and preparations based on extracts and by-products of the studied tissues can be associated with the peptide-protein composition.

The studied objects are multicomponent protein-peptide complexes. The use of a number of methods of sequential sample preparation, separation by 2D electrophoresis, fractionation by chromatography allows obtaining

data on the nature (composition and relative amount) of the protein profile with visualization of the protein pool of the studied extracts.

The purpose of the study was to decipher the protein profile and identify the biologically active compounds of the peptide-protein fraction of antlers from *Cervus nippon* and *Cervus elaphus*. The tasks were to develop methods for sample preparation of extracts of the tissues under different conditions, selection of conditions for further protein profiling and their identification in natural raw materials by the methods of 2D-PAGE, SEC and HPLC-MS after enzymatic hydrolysis by trypsin.

Materials and Methods

The samples of extracts from antlers of the sika deer (VDA) (*Cervus nippon*) and antlers of the red deer (ARD) (*Cervus elaphus*) were received from the collection of the bioanalytical research laboratory (SCBMT FMBA of Russia), obtained under the technology of water-alcohol extraction and subsequent lyophilization.

Materials

In our research, solvents and reagents of analytical degree of purity were used. Solutions for sample preparation were prepared using deionized water. To assess the presence of compounds of peptide or protein nature, an optional go spectrophotometer (Thermo scientific, USA) with 96-well cuvettes 10 mm long (“Corning”, USA) used by spectroscopic method. The degree of proteolysis was assessed using a diode-matrix detector 1260 PAH UG Max-light cell connected to a high-performance liquid chromatograph 1260 infinity II of the laboratory of the OGRN pump equipped with a built-in degasser, equipped with an automatic sample entry system Multisampler 1260, and a unit for thermostating the chromatographic column (“Agilent technologies”, USA).

HPLC-MS/MS HR analysis was performed using liquid chromatograph model 1290 infinity II “Agilent technologies”, equipped with

pump 2-channel degasser, equipped with automatic input samples Multisampler 1290 with mass spectrometric detector QTOF 6545XT with ESI-ionisation at atmospheric pressure (“Agilent technologies”, USA), the server station computer (“HP”, USA), chromatographic column columns with different 300SB-C18, length 250 mm and internal diameter 2.1 mm, the size of the sorbent is 5.0 μm with a pore size of 300 Å and it is optimal for peptide mapping with a length of 150 mm and an internal diameter of 2.1 mm, the size of the sorbent is 2.7 μm (“Agilent”, USA).

2D page electrophoresis was performed using a ready-made kit ReadyPrep 2-nd starter kit, strips ReadyStrip IPG strip, 11 cm, pH 4–7 gels criterion TGX any KD dye bio-Safe Coomassie stain, the results were detected on the Gel system Doctor EZ system using the software image Lab bio-rad (“Bio-rad”, USA).

SEC analysis was performed on a chromatographic system of medium pressure to detect NGS (“Bio-rad”, USA), equipped with a multi-wave spectrophotometric detector, a pH sensor of eluent, a conductometric cell and a chromatographic column for high-resolution SEC analysis Enrich SEC-650, as calibration standards with known molecular masses, gel filtration was used-standard (“Bio-rad”, USA).

To identify proteins, a database of polypeptide sequences was used on the Internet (www.ebi.uniprot.org) and the program for the collection and processing of spectrum data Mill MS proteomics workbench (“Agilent”, USA).

Methods

Total protein determination was performed by the Bradford protein assay without prior protein precipitation in accordance with the general pharmacopoeial monograph (1.2.3.0012.15, “Protein Determination”) of the RFSP. The lyophilisate of the extract was pre-dissolved in purified water to a concentration of 150 mg/ml in a volume of solvent. The amount of protein was determined by the cal-

ibration curve for a solution of bovine serum albumin.

All procedures of *two-dimensional separation by electrophoresis* of proteins were performed according to the protocol included in the kit. The amount of the sample was taken at the rate of 250 mg of protein per 185 μ l of denaturing solution. In two-dimensional electrophoresis, the first stage of separation is isoelectric focusing. Proteins are separated by electrophoresis based on their pI, the pH value at which the protein does not carry a net charge. The second separation stage is SDS-PAGE, where proteins already separated by IEF are further separated by their size. Gels were previously washed with distilled water and filled with a 200–300 ml paint solution and left overnight for better staining at room temperature. The next day, the gels were washed with distilled water in triplicate and the results were detected on the Gel Doc EZ System.

The molecular weight protein distribution of the product was carried out on a high pressure liquid isocratic chromatograph with a spectrophotometric flow detector with a wavelength of 280 nm.

Analysis on an Agilent Technologies 1260 Infinity II liquid chromatograph was performed in AutoMSMS mode. AdvanceBio Peptide Mapping Chromatographic Column, precursor ZORBAX Extend-C18 Narrow-Bore Guard Column were used. Elution was carried out with a mixture consisting of components A and B in the gradient mode: up to 0.5 min — 5% B, from 0.5 to 15.0 min increased to 35% B, from 17.0 — to 95% and held for 13 min, from 30.01 minutes — returns to initial conditions. The column equilibration time for initial conditions is 5 minutes. Component A was a 0.1% solution of formic acid in deionized water, component B was a 0.1% solution of formic acid and 10% deionized water in acetonitrile. The flow rate was 400 μ l/min, the analysis time was 30 minutes. Conditions of mass spectrometric detection are shown in Table 1.

Results and discussion

Total protein determination

Percentage of total protein concentration according to the Bradford method studied extracts demonstrates that the largest amount of protein (30%) is in the VDA sample, and the

Table 1. Conditions for mass spectrometric detection

Таблица 1. Условия масс-спектрометрического детектирования

Parameter name	Value
Mass spectrometry detector	QTOF 6545XT
Ionization source	Dual Agilent Jet Stream Electrospray Ionization (Dual AJS ESI)
Resolution	60,000
Type of collisional dissociation cell	Collisional dissociation cell
Ionization energy	(30 \pm 15)%
Detectable charge state	2–5
Scan mode	AutoMSMS
Detected mass range	100–1700
Polarity of detected ions	Positive ion detection
Spray voltage	3,5 kV
Fragmenter voltage	175 V
Flow rate of desiccant dryer gas	13 l/min
Nebulizer gas pressure	35 psig
Spray temperature	250°C

smallest (~20%) in ARD . The coefficient of variation does not exceed 10%.

2D PAGE

Using the method of 2D PAGE held comparative proteome analysis was done on basis results received of samples VDA and ARD. Identification by molecular mass and meaning pI was held with using Image Lab Bio-rad software (Figs 1 and 2).

In the VDA sample, more than 30 marker plots were counted. By the pI values, 3 groups of proteins can be distinguished: 1) pI=4.1.

Molecular weight: 12.1, 23.8, 39.5, 50.2 and 66.4 kDa; 2) pI=5.0–6.0. Molecular weights: 18–20 kDa and 70–105 kDa; 3) pI=7.0. This group shows a large accumulation of proteins with a mass about of 15 kDa, which may indicate a significant amount of low molecular weight proteins.

The second sample shows the best separation with the display of about 90 marker plots. According to the IEF more groups can be distinguished than in the first sample, but the molecular mass distribution remains very similar.

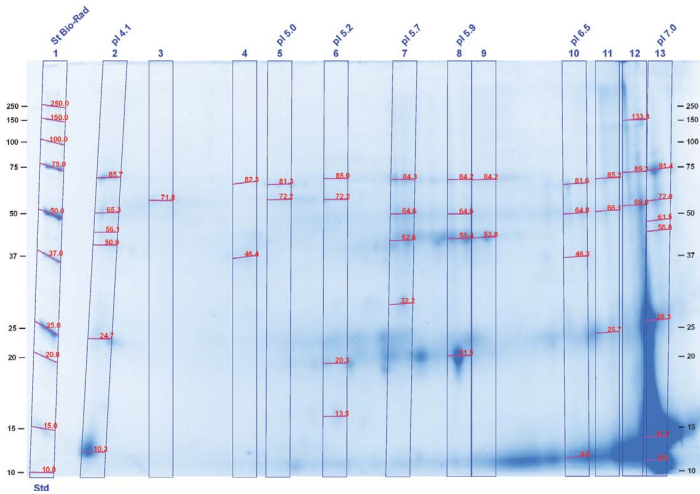


Fig. 1. 2D PAGE of ARD sample stained with Coomassie.
Рис. 1. 2D-электрофорез ПБО, окрашенного кумасси.

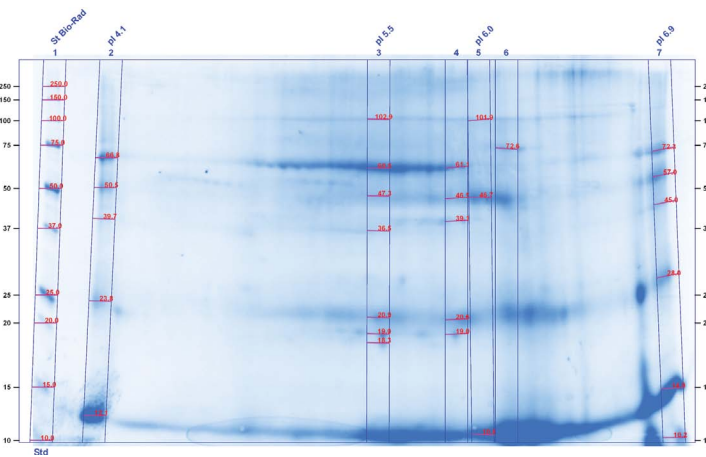


Fig. 2. 2D PAGE of VDA sample stained with Coomassie.
Рис. 2. 2D-электрофорез ППО, окрашенного кумасси.

Observed masses in the low area of 11–15, 20 and 25 kDa. In the field of medium weights, this range is from 50 to 75 kDa. No area with large molecular masses of proteins were detected.

The large dynamic range of concentrations of the studied extracts, as well as the wide variability of the physicochemical properties of the components in their composition, necessitates the use of multistage separation technologies with predominant use of SEC, 2D PAGE, specialized chromatographic chips, and all their possible combinations with technological methods (solid phase extraction, precipitation, exhaustion, etc.).

Size-exclusion chromatography

VDA sample demonstrated similar profile at low molecular weight areas as well as ARD sample. Also the meanings received from 2D PAGE result are confirmed by SEC at more high areas of molecular mass distribution. Received chromatograms are presented in pictures 3 and 4 and relevant values of molecular masses are demonstrated in the Table 2.

HPLC-MS

Peptide mass spectrometry is currently rapidly improving as the methodological basis of proteomics, both in terms of qualitative and quantitative analysis [2]. Unlike proteomics, based on controlled protein cleavage into peptides with “predictable” terminal amino acids, peptide — mass spectrometry is aimed at analyzing native peptides.

According to the results of previous analyzes, indicating a closely related component protein composition of the extracts and based on the most pronounced results for subsequent analysis, VDA extracts were used in this step. The result of the decoding of the protein profile of the fraction from the VDA and their classification became the annotated groups of proteins presented below (Figs 5 and 6). HPLC-MS analysis after enzymatic hydrolysis with trypsin demonstrated the identification of a large number of protein components in both fractions. For a more convenient perception, the obtained data was analyzed in the UniProt

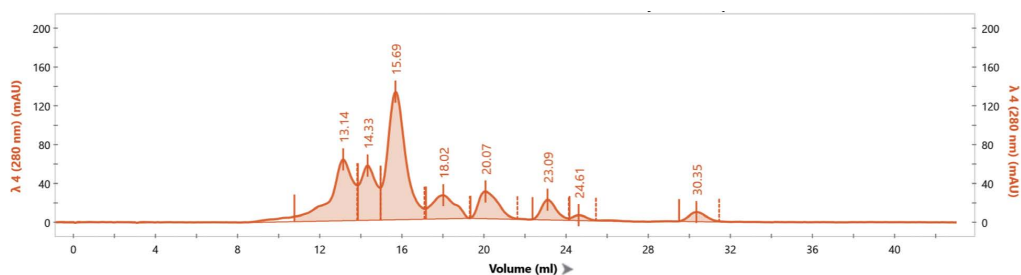


Fig. 3. SEC water solution of the ARD extract.

Рис. 3. ГРХ водного раствора экстракта ПБО.

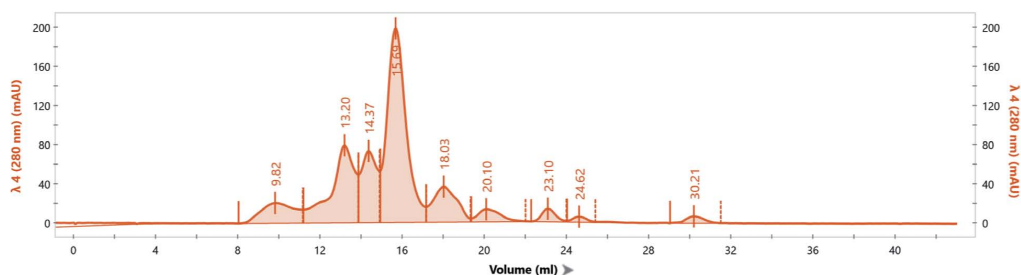


Fig. 4. SEC water solution of the VDA extract.

Рис. 4. ГРХ водного раствора экстракта ППО.

Table 2. The results of SEC from VDA and ARD extracts*
Таблица 2. Результаты ГРХ по экстрактам ПБО и ППО*

Molecular weight distribution in ARD extract						
Peak number	The volume of output, ml	Column volume, ml	Column dead volume, ml	Kav, distribution coefficient	Mol. weight, Da	The contribution of the peak, %
1	13.14	23.56	8	0.33	166725	20.02
2	14.33	23.56	8	0.41	75638	12.27
3	15.69	23.56	8	0.49	30651	33.41
4	18.02	23.56	8	0.64	6522	7.91
5	20.07	23.56	8	0.78	1671	7.57
6	23.09	23.56	8	0.97	225	4.32
Molecular weight distribution in VDA extract						
Peak number	The volume of output, ml	Column volume, ml	Column dead volume, ml	Kav, distribution coefficient	MW, Da	The contribution of the peak, %
1	9.82	23.56	8	0.12	1512382	7.87
2	13.2	23.56	8	0.33	160211	20.44
3	14.37	23.56	8	0.41	73655	12.5
4	15.69	23.56	8	0.49	30651	41.82
5	18.03	23.56	8	0.64	6478	9.7
6	20.1	23.56	8	0.78	1638	3.26
7	23.1	23.56	8	0.97	223	2.04

Note: * — In these calculations, when building a calibration curve, the coefficient of determination is 0.99.

Примечание: * — В данных расчетах при построении калибровочной кривой коэффициент детерминации равен 0,99.

database, which reflected the enormous number of functions and biological roles of protein components from the studied fractions. In total, 435 protein components were found in extracts from VDA, including 75, which were also not experimentally established in the deer antlers. The diagrams demonstrate general directions of functions and processes involving the identified proteins. Table 3 shows the brightest representatives of the studied profiles with the highest index of similarity.

In the classification according to molecular functions of protein components from the VDA fraction, four directions predominate: transferases, hydrolases, DNA/RNA-binding. Proteins that realize transport functions dominate involvement in biological processes.

The results given in Table 3 constitute a representatively selected part of the analyzed protein components of the tissues under study; however, they are among the known

and significant among all. Particular attention is caused identified in the extracts from the VDA: PPARG1A, Wnt protein, CB1, PFL.

Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 (PPARGC1A) is a coactivator of nuclear receptors and other transcription factors that regulate metabolic processes, including biogenesis and respiration of mitochondria, hepatic gluconeogenesis and switching between types of muscle fiber [7].

Wnt proteins are a large number of secreted molecules involved in cell-to-cell signaling. The influence of the Wnt protein controls many cellular processes in many different organisms. Signal transmission based on the interaction with this molecule is largely associated with tumor genesis, early embryonic mesodermal pattern, brain and kidney morphogenesis, regulation of breast proliferation and Alzheimer's disease [5, 8].

Молекулярные функции

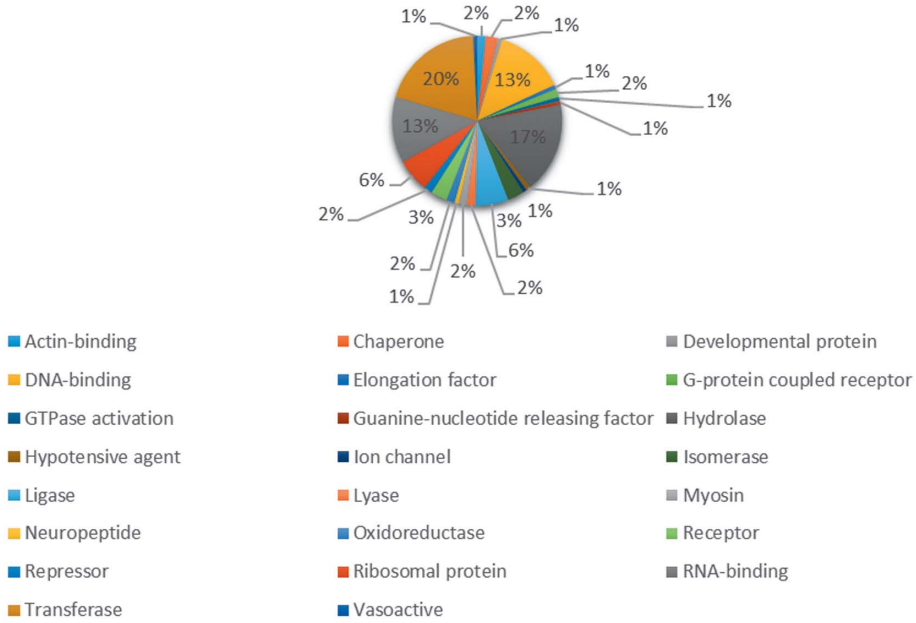


Fig. 5. Groups of proteins from VDA extracts, distributed by molecular functions.

Рис. 5. Группы белков из экстрактов ППО, распределенные по молекулярным функциям.

Биологические процессы

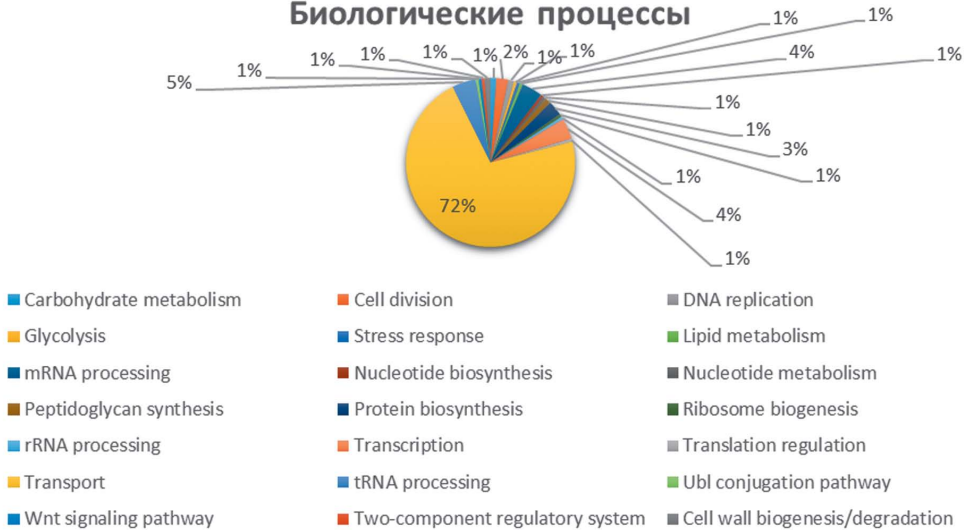


Fig. 6. Protein groups from VDA extracts, distributed by biological processes.

Рис. 6. Группы белков из экстрактов ППО, распределенные по биологическим процессам.

Table 3. Molecular mass characteristics of some typical annotated proteins in the composition of the VDA extract
Таблица 3. Молекулярно-массовые характеристики некоторых типичных аннотированных белков в составе экстракта ППО

Protein number	MS/MS Score	Amino acid coverage, %	Total spectral intensity	MW, Da	Protein name
1	55.61	6.8	1.54E+06	66149	Serum albumin (Fragment)
2	48.51	4.9	1.49E+06	69080	ALB
3	43.71	12.3	3.09E+06	42765	HBA
4	42.4	30.3	5.21E+06	15953	Adult beta-globin
5	33.18	23.4	3.26E+06	15824	Hemoglobin subunit beta-3
6	21.95	10.3	2.12E+05	19244	HBB
7	21.47	14.2	3.43E+06	15952	Beta-globin subunit
8	12.44	6.1	1.86E+05	16522	HBG-T2
9	12.60	4.1	3.13E+05	30235	APOA1
10	12.31	2.5	3.90E+04	39576	FETUB (Fragment)
11	10.65	2.8	6.47E+04	32307	Vps23 core domain protein
12	10.36	4.9	6.50E+04	26317	HSD11B1L
13	10.27	2.8	9.22E+04	46667	GABRD
14	10.25	3.8	2.16E+05	34418	MDH1B (Fragment)
15	9.98	2.5	1.04E+05	34364	MRPL2
16	9.68	2.8	4.49E+05	23404	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
17	9.22	3.4	2.77E+05	60607	DNA topoisomerase
18	8.95	2.2	1.53E+05	34361	Iron ABC transporter substrate-binding protein
19	8.93	5.9	8.06E+04	26292	GntR family transcriptional regulator
20	8.06	7.5	2.91E+05	16021	BUB3
21	7.80	4.7	9.29E+04	23302	WRN
22	7.47	2.2	9.41E+04	55725	Phosphoglucomutase
23	7.44	5.0	1.46E+05	19653	Histone H4
24	7.40	8.7	7.39E+04	23879	Arginine/serine-rich 7 splicing factor (Fragment)
25	7.23	6.1	6.51E+04	10838	Rhodanese-like domain-containing protein
26	7.20	2.3	1.17E+05	38297	Methionine import ATP-binding protein MetN
27	7.17	3.9	5.85E+05	27897	HAD family hydrolase
28	7.08	3.7	7.83E+04	15634	HTH-type transcriptional regulator LrpC
29	6.72	2.6	8.52E+04	41870	Beta sliding clamp
30	6.45	3.9	1.44E+05	20987	PPEF2 (Fragment)
31	6.19	5.0	1.07E+05	35138.7	Protein Wnt
32	4.02	1.3	3.03E+04	83831	Formate C-acetyltransferase
33	3.82	3.6	3.93E+03	37282.6	Cannabinoid receptor 1 (Fragment)
34	3.0	4.2	4.86E+05	25684.1	PPARGC1A

The cannabinoid receptor type 1 (CB1) is a cannabinoid G-protein coupled receptor. The CB1 receptor is expressed predominantly in the peripheral and central nervous systems and is activated by: endocannabinoids, a group of retrograde neurotransmitters; plant phytocannabinoids, such as tetrahydrocannabinol and its synthetic analogues [4].

Pyruvate formate-lyase (PFL) or formate C-acetyltransferase is an enzyme in the transferase family that helps regulate anaerobic glucose metabolism. It catalyzes the reversible conversion of pyruvate and coenzyme-A to formate and acetyl-coenzyme A. This enzyme is involved in the metabolic pathways of pyruvate, propionate and butyrate [9].

Conclusions

Using two-dimensional gel electrophoresis and size-exclusion chromatography, protein profiling and molecular-mass distribution data were obtained from proteins in VDA extracts under denaturing conditions.

Using the Bradford method, the content of total water-soluble proteins in the extracts was evaluated. The effect of detergent additives and extraction conditions on the total protein level in lyophilisates was revealed.

The HPLC-MS assay of extract samples identified extensive and representative groups

of proteins that characterize the features of a wide spectrum of biological activity of the objects under study. The identification of the most significant (major and minor) protein components in the extracts was carried out in accordance with the search software Spectrum Mill MS Proteomics Workbench and the Uniprot protein database. As a result of the interpretation of the protein composition of the studied VDA extracts, all the detected proteins are clustered according to molecular and biological functions. Relationships of the identified proteins with possible mechanisms of biological actions and targets that can be affected by the protein components of the objects under study are displayed. According to the results of the study, conclusions about the multicomponent protein composition of VDA and ARD extracts were drawn. Marker protein components were proposed as part of the extracts under study, and possible relationships of the detected proteins in extracts with biological effects were indicated.

The proteins are of main future interest, based largely on involvement in life processes: PPARGC1A, CB1, Wnt and PFL. In total, more than 400 endogenous animal proteins in the VDA extract were detected and 66 annotated proteins were identified from among them.

REFERENCES | СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [Kovaleva S.V., Isaeva I.V., Luttseva A.I., Aladyshcheva Zh.I., Pikhtar' A.V. Problemy standartizatsii gormonal'nykh preparatov peptidno-belkovoy prirody [Problems of standardization of hormone preparations of peptide-protein nature]. *Rossiyskiy khimicheskij zhurnal imeni D.I. Mendeleeva [Russian J. of Chemical Society of them D.I. Mendeleev]*. 2005;XLIX(1):135–145. (In Russian)]. Ковалева С.В., Исаева И.В., Лутцева А.И., Аладышева Ж.И., Пихтарь А.В. Проблемы стандартизации гормональных препаратов пептидно-белковой природы. *Российский химический журнал*. 2005;XLIX(1):135–145.
- [Lebedev A.T., Artemenko K.A., Samgina T.Yu. *Osnovy mass-spektrometrii belkov i peptidov [Basics of mass spectrometry of proteins and peptides]*. Moscow: Tekhnosfera, 2012. 176 p. (In Russian)]. Лебедев А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. *Основы масс-спектрометрии белков и пептидов*. М.: Техносфера, 2012. 176 с.
- [Suslov N.I., Gur'yanov Yu.G. *Produktsiya na osnove pantogematogena. Mekhanizmy deystviya i osobennosti primeneniya [Products based on pantohepatogen. Mechanisms of action and application features]*. Novosibirsk: Siberian University Publishing, 2004. 144 p. (In Russian)]. Суслов Н.И., Гурьянов Ю.Г. *Продукция на основе пантогематогена. Механизмы действия и особенности применения*. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2004. 144 с.
- Abood M., Barth F., Bonner T.I., Cabral G., Casellas P., Cravatt B.F., Devane W.A., Elphick M.R., Felder C.C., Herkenham M., Howlett A.C., Kunos G., Mackie K., Mechoulam R., Pertwee R.G. Cannabinoid receptors: CB1 receptor. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology*.

- De Ferrari G.V., Inestrosa N.C. Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.* 2000;33(1):1–12.
- Koroleva S.V., Ashmarin I.P. Functional continuum of regulatory peptides (RPs): vector model of RP-effects representation. *J. of Theoretical Biology.* 2002;216(3):257–271.
- Lin J., Wu H., Tarr P.T., Zhang C.-Y., Wu Z., Boss O., Michael L.F., Puigserver P., Isotani E., Olson E.N., Lowell B.B., Bassel-Duby R., Spiegelman B.M. Transcriptional co-activator PGC-1-alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 2002;418:797–801.
- Willert K., Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a007864.
- Lin J., Wu H., Tarr P.T., Zhang C.-Y., Wu Z., Boss O., Michael L.F., Puigserver P., Isotani E., Olson E.N., Lowell B.B., Bassel-Duby R., Spiegelman B.M. Transcriptional co-activator PGC-1-alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 2002;418:797–801.
- Willert K., Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a007864.
- Lin J., Wu H., Tarr P.T., Zhang C.-Y., Wu Z., Boss O., Michael L.F., Puigserver P., Isotani E., Olson E.N., Lowell B.B., Bassel-Duby R., Spiegelman B.M. Transcriptional co-activator PGC-1-alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 2002;418:797–801.
- Willert K., Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a007864.
- Lin J., Wu H., Tarr P.T., Zhang C.-Y., Wu Z., Boss O., Michael L.F., Puigserver P., Isotani E., Olson E.N., Lowell B.B., Bassel-Duby R., Spiegelman B.M. Transcriptional co-activator PGC-1-alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 2002;418:797–801.
- Willert K., Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012. DOI: 10.1101/cshperspect.a007864.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS | СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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

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

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

Дуля Максим Сергеевич*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: mdulya@gmail.com

Daniil V. Khvostov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Хвостов Даниил Владиславович, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

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

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: ageldinov@gmail.com

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

Люблинский Станислав Львович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»

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

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

* Corresponding author / Автор, ответственный за переписку

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-24-33>



ИМПУЛЬСНОЕ МАГНИТНОЕ ПОЛЕ КАК СРЕДСТВО ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРЕНИРОВОЧНОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ИНТЕРВАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ У КРЫС

О.М. Лабынцева, О.А. Захарова*, Ю.Е. Ананьева, Е.Г. Рохмистрова, Е.П. Лобкаева

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

В работе приведены результаты исследований влияния комбинированного воздействия курса умеренной нормобарической гипоксии (НГГ) и импульсного магнитного поля (ИМП) на неспецифическую резистентность и устойчивость организма крыс к острой гипоксии. Установлено, что совместное применение курса умеренной НГГ и ИМП сопровождалось эффектами аддитивности и характеризовалось повышением неспецифической резистентности крыс к острой гипоксической гипоксии.

Ключевые слова: умеренная нормобарическая гипоксия, импульсное магнитное поле, острая гипоксическая гипоксия, неспецифическая резистентность, параметры крови

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Лабынцева О.М., Захарова О.А., Ананьева Ю.Е., Рохмистрова Е.Г., Лобкаева Е.П. Импульсное магнитное поле как средство повышения эффективности тренировочной нормобарической интервальной гипоксии у крыс. *Биомедицина*. 2019;15(2):24–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-24-33>

Поступила 06.02.2019

Принята после доработки 05.03.2019

Опубликована 10.06.2019

PULSED MAGNETIC FIELD AS A MEANS OF INCREASING THE EFFICIENCY OF NORMOBARIC INTERVAL HYPOXIA TRAINING IN RATS

Olga M. Labyntseva, Olga A. Zakharova*, Juliya E. Ananieva, Elena G. Rokhmistrova,
Yevgeniya P. Lobkayeva

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

This paper presents the results of investigations aimed at studying the combined effect of the course of moderate normobaric hypoxia (MNH) and pulsed magnetic field (PMF) on nonspecific resistance to acute hypoxia in rats. It is established that the combined application of MNH and PMF is followed by the effects of additivity, thus increasing the nonspecific resistance of rats to acute hypoxic hypoxia.

Keywords: moderate normobaric hypoxia, pulsed magnetic field, acute hypoxic hypoxia, nonspecific resistance, blood parameters

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

For citation: Labyntseva O.M., Zakharova O.A., Ananieva Ju.E., Rokhmistrova E.G., Lobkayeva Ye.P. Pulsed Magnetic Field as a Means of Increasing the Efficiency of Normobaric Interval Hypoxia Training in Rats. *Journal Biomed*. 2019;15(2):24–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-24-33>

Submitted 06.02.2019

Revised 05.03.2019

Published 10.06.2019

Введение

Устойчивость организма к гипоксии является одним из фундаментальных предметов исследования как прикладной физиологии, так и авиационной и спортивной медицины. В настоящее время разработан целый арсенал средств и методов, модифицирующих устойчивость организма к гипоксии, основными из которых являются тренировка испытуемых и специальные фармакологические средства [1, 19, 21, 23]. В клинической практике одним из эффективных и научно обоснованных методов повышения устойчивости к острому гипоксическому состоянию является метод нормобарической интервальной гипоксии (НИГ). Данный метод, относящийся к естественным стресс-факторам, способен активизировать компенсаторно-приспособительные механизмы организма к воздействию целого ряда экстремальных факторов внешней среды [7, 14, 19, 20, 27]. Известно, что при комплексном использовании с другими методами специфической и неспецифической тренировки НИГ обладает потенциальной возможностью интенсификации адаптивной перестройки в организме [5, 6, 16, 18]. В физиотерапевтической практике широко применяется метод магнитотерапии, в основе эффективности которого лежит биологическое действие, направленное на повышение неспецифической резистентности организма без стрессового и субстрессового напряжения его физиологических функций [22]. В настоящем исследовании в качестве одного из методов повышения эффективности НИГ предложено применение импульсного магнитного поля. Ранее нами было показано [12], что низкочастотное импульсное магнитное поле с заданными параметрами, генерируемое установкой «Бутон», приводит к развитию адаптивных реакций в ответ на гипоксическое воздействие.

Цель работы состояла в исследовании влияния комбинированного воздействия курса умеренной нормобарической гипоксии и импульсного магнитного поля на неспецифическую резистентность организма и устойчивость крыс к острой гипоксии.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на половозрелых белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г в количестве 160 особей, которые были приобретены в питомнике «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» (Московская область). Животные содержались в условиях вивария на стандартном пищевом рационе при естественной смене дня и ночи.

Животные были разделены на 4 группы по 40 особей: 1 группа — контроль, 2 группа подвергалась нормобарической гипоксической гипоксии (НГГ), 3 группа — воздействию импульсного магнитного поля (ИМП) и 4 группа — сочетанному действию НГГ и ИМП (табл. 1). Каждая из групп делилась на две равные подгруппы. У животных первой подгруппы проводилось изучение изменения устойчивости к острой гипоксической гипоксии в условиях моделируемого острого гипоксического состояния. У животных второй подгруппы по изменению состояния системы крови оценивали общую неспецифическую резистентность организма.

Нормобарическая гипоксическая тренировка представляла собой курс, состоящий из 14-ти сеансов дыхания гипоксической газовой смесью (ГГС), проводимых ежедневно. Продолжительность сеанса гипоксии в первый день составляла 15 мин непрерывного вдыхания ГГС. В дальнейшем длительность сеансов ежедневно увеличивали на 5 мин, к 4-му дню она достигала

Таблица 1. Распределение животных по группам

Table 1. Distribution of animals by groups

Группа	Количество животных, особей	НГГ, 14 дней	Схема воздействия		
			МП*, однократно	ОГГ, однократно	Забор крови, через сутки
Контроль	20	МВ	МВ	+	-
	20	МВ	МВ	-	+
НГГ	20	+	-	+	-
	20	+	-	-	+
МП	20	МВ	+	+	-
	20	МВ	+	-	+
НГГ+МП	20	+	+	+	-
	20	+	+	-	+

Примечание: * — воздействие МП осуществлялось непосредственно после последнего сеанса НГГ.

Note: * — exposure to magnetic field was carried out immediately after the last session of NHH (normobaric hypoxic hypoxia).

30 мин и оставалась неизменной до 14-го дня. Содержание кислорода в ГГС составляло 5% на протяжении всего курса. Для стандартизации экспериментов подаваемый в бокс с животным поток газа был выбран в диапазоне $10 \pm 0,05$ л/мин. Обработку крыс проводили в гипоксикаторе групповым методом по 10 особей.

Воздействие импульсным магнитным полем осуществлялось с использованием магнитогенератора «Бутон» (свидетельство на товарный знак № 386501 от 03.12.2007) со значением модуля магнитной индукции в центре рабочей зоны индуктора до $3,5 \pm 0,2$ мТл, формой сигнала вида затухающей синусоиды $U(t) = U_0 \cdot e^{-at} \cdot \sin \omega t$, при $U_0 = 150-300$ В, частотой ≈ 100 Гц, частотой следования импульсов $1,0 \pm 0,1$ Гц.

Для обработки магнитным полем животных помещали в контейнер с прозрачными стенками без ограничения движения, который размещали в рабочей зоне установки. Воздействие магнитным полем осуществляли тотально в течение 30 мин, со сменной максимального значения модуля магнитной индукции каждые 10 мин по схеме 1,5–3,2–1,5 мТл. Тестирование параметров магнитного поля проводили однокомпонентным тесламетром ТП2-2У.

Определение устойчивости организма к развитию патофизиологических процессов по времени развития стадий возбуждения, судорог и комы проводили путем моделирования острого гипоксического состояния (ОГС) с помощью гипоксической газовой смеси (ГГС), содержащей 1% кислорода и 99% азота, спустя сутки после окончания последнего воздействия.

Забор крови осуществляли путем декапитации спустя сутки после окончания последнего воздействия. Клинико-биохимические исследования крови проводили стандартными клиническими методами [15].

Проверка на нормальность распределения проведена с использованием W-теста Шапиро — Уилка [8, 13]. Оценка статистической значимости различий средних значений показателей двух независимых групп проведена с использованием t-критерия Стьюдента (при нормальном распределении данных) и U-критерия Манна — Уитни (при распределении отличном от нормального) с вероятностью $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Данные, полученные в ходе экспериментального исследования, представлены в таблицах 2–5. Анализ результатов показал,

что адаптация крыс к умеренной гипоксии привела к статистически значимому увеличению времени наступления стадий острого гипоксического состояния у крыс группы НГГ при сравнении с исходными значениями показателей ОГС. Время наступления стадии судорог и стадии комы увеличилось в 1,3 раза ($p \leq 0,001$) и в 1,5 раза ($p \leq 0,001$) соответственно. В среднем крысы группы НГГ после воздействия острой гипоксии в коме пребывали в 5,5 раза ($p \leq 0,001$) дольше исходного среднего значения данного показателя этих крыс. Время наступления стадии агонии смещалось в сторону увеличения и составляло $66,80 \pm 3,84$ с, что в 2,7 раза ($p \leq 0,001$) больше в сравнении с исходным уровнем (табл. 2).

При сравнении данных вторичного воздействия острой гипоксии на крыс групп НГГ и МВ получены аналогичные результаты сравнения крыс группы НГГ со своим исходным уровнем: статистически значимое увеличение наступления всех стадий ОГС.

В результате исследования получено увеличение времени наступления стадий острого гипоксического состояния у крыс группы НГГ при сравнении с контролем. Так, время наступления стадии судорог увеличилось в 1,3 раза ($p \leq 0,001$), а стадии комы — в 1,5 раза ($p \leq 0,001$). Время наступления стадии агонии смещалось в сторо-

ну увеличения и составляло $66,80 \pm 3,84$ с, что в 2,7 раза ($p \leq 0,001$) больше в сравнении с уровнем контроля. Данные изменения свидетельствуют о развитии адаптивных процессов к умеренной гипоксической гипоксии.

В ходе клинико-биохимического исследования крови (табл. 3) получено увеличение концентрации глутатиона на 8% ($p \leq 0,05$) при недостоверном росте концентрации МДА, увеличение фагоцитарной активности (ФА) на 37% ($p \leq 0,001$) и фагоцитарного числа (ФЧ) на 63% ($p \leq 0,001$), а также увеличение числа формазан-положительных нейтрофилов в 1,48 раза ($p \leq 0,001$) в НСТсп-тесте при неизменном их количестве в НСТинд-тесте относительно контроля (табл. 5). Повышение активности антиоксидантной системы и изменение метаболической активности нейтрофилов указывают на формирование адаптивного эффекта и повышение активности клеточного звена неспецифической резистентности организма к нормобарической гипоксии. Увеличенное количество лейкоцитов (на 21%, $p \leq 0,05$) указывает на формирование структурного следа адаптации к умеренной гипоксической гипоксии в течение заданного промежутка времени (14 дней).

Воздействие ИМП не оказывало влияния на развитие патофизиологических процессов. Время наступления стадии клонико-

Таблица 2. Сравнительный анализ времени начала стадий острого гипоксического состояния у животных между экспериментальными группами НГГ, МП и (НГГ+МП)

Table 2. Comparative analysis of the time of the onset of acute hypoxic state stages in the animals between experimental groups of NHH, MF and (NHH+MF)

Группы	Время наступления стадий ОГС, с		
	T1 (судороги)	T2 (кома)	T3 (начало агонии)
Контроль	11,45±0,37	17,10±0,34	25,30±0,73
НГГ	14,85±0,47***	24,55±0,51***	66,80±3,84***
МП	11,15±0,39	17,40±0,55	24,75±0,99
НГГ+МП	13,70±0,67***	28,05±0,80***^^	73,90±4,23***

Примечание: *** — достоверное отличие от контроля, критерий Стьюдента, $p \leq 0,001$; ^^ — достоверное отличие от НГГ, критерий Стьюдента, $p \leq 0,001$.

Note: *** — significant difference from the control, Student's test, $p \leq 0.001$; ^^ — significant difference from NHH, Student's test, $p \leq 0.001$.

Таблица 3. Результаты гематологических исследований
Table 3. Results of hematological studies

Показатели крови	Тип воздействия			
	МВ (контроль)	МП	НГГ	НГГ+МП
Количество эритроцитов, 10 ¹² /л	7,43±0,11	7,23±0,22	7,46±0,13	7,59±0,19
Нб, г/л	127,34±2,51	134,72±2,98	130,67±2,27	138,68±2,79 ^{***^}
Нт, %	39,58±0,48	41,30±0,47*	40,21±0,41	40,74±0,34
МСН, пг	17,19±0,39	19,07±0,88*	17,58±0,38	18,40±0,61*
МСНС, г/дл	32,21±0,61	32,74±0,71	32,41±0,58	34,01±0,64*
MCV, фл	53,46±0,98	58,35±2,47	54,02±1,03	54,18±1,26
Количество ретикулоцитов, ‰	15,93±1,56	20,86±1,39*	15,45±1,50	19,61±1,42 [^]
Количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л	11,29±0,69	10,19±0,69	13,69±0,94*	12,05±0,87
Лимфоциты, %	80,30±1,57	81,20±1,36	84,35±1,09*	84,53±1,75*
Палочкоядерные нейтрофилы, %	0,20±0,12	0,07±0,02*	0,40±0,12	0,37±0,14
Сегментоядерные нейтрофилы, %	15,90±1,58	11,90±1,03	11,45±1,10*	12,58±1,52
Эозинофилы, %	3,45±0,49	2,60±0,56	2,70±0,39	2,21±0,46*
Моноциты, %	0,15±0,08	0,55±0,16*	0,90±0,21 ^{**}	0,26±0,13

Примечание: * — достоверное отличие от контроля, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$; ** — достоверное отличие от контроля, критерий Стьюдента, $p \leq 0,01$; ^ — достоверное отличие от НГГ, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$.
Note: * — significant difference from the control, Student's test, $p \leq 0,05$; ** — significant difference from the control, Student's test, $p \leq 0,01$; ^ — significant difference from NHH, Student's test, $p \leq 0,05$.

Таблица 4. Состояние системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты
Table 4. The state of the system of lipid peroxidation and antioxidant protection

Показатели крови	Тип воздействия			
	МВ (контроль)	МП	НГГ	НГГ+МП
МДА, мкмоль/мл	1,83±0,05	1,86±0,05	2,01±0,07	1,82±0,05 [^]
Каталаза, моль/(мин·л)	6,41±0,10	5,99±0,12*	6,19±0,14	6,30±0,08
Восстановленный глутатион, мкмоль/мл эр. взвеси	2,34±0,05	2,53±0,04*	2,52±0,06*	2,47±0,04*

Примечание: * — достоверное отличие от контроля, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$; ^ — достоверное отличие от НГГ, критерий Стьюдента, $p \leq 0,05$.
Note: * — significant difference from the control, Student's test, $p \leq 0,05$; ^ — significant difference from NHH, Student's test, $p \leq 0,05$.

Таблица 5. Фагоцитарная и метаболическая активность нейтрофилов
Table 5. Phagocytic and metabolic activity of neutrophils

Показатели крови	Тип воздействия			
	МВ (контроль)	МП	НГГ	НГГ+МП
Фагоцитарная активность, %	50,55±1,39	59,25±2,06 ^{***}	69,40±1,09 ^{***}	59,75±1,58 ^{***^^^}
Фагоцитарное число, частица	10,09±0,27	16,00±0,66 ^{***}	16,51±0,36 ^{***}	11,76±0,44 ^{***^^^}
% НСТсп	13,37±0,50	13,53±1,28	19,83±1,01 ^{***}	35,32±2,15 ^{***^^^}
% НСТинд	27,64±1,28	24,75±1,89	29,55±1,45	40,25±2,39 ^{***^^^}

Примечание: *** — достоверное отличие от контроля, критерий Стьюдента, $p \leq 0,001$; ^^ — достоверное отличие от НГГ, критерий Стьюдента, $p \leq 0,001$.
Note: *** — significant difference from the control, Student's test, $p \leq 0,001$; ^^ — significant difference from the NHH group, Student's test, $p \leq 0,001$.

тонических судорог, комы и агонии не отличалось от соответствующих контрольных показателей. При анализе показателей крови отмечено формирование защитно-компенсаторных реакций в ответ на предъявленное воздействие. Об этом свидетельствует рост количества ретикулоцитов в 1,31 раза ($p \leq 0,05$), увеличение уровня гематокрита на 4% ($p \leq 0,05$) и средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСН) на 10,9% ($p \leq 0,05$). Импульсное магнитное поле практически не оказывало влияния на процессы перекисного окисления липидов, о чем свидетельствует недостоверное изменение в пределах физиологических значений уровня МДА. Однако имела место реакция со стороны антиоксидантной системы: уровень восстановленного глутатиона повышался на 8% ($p \leq 0,05$). Отмечено увеличение поглотительной способности нейтрофилов: ФА повысилась на 17% ($p < 0,001$), ФЧ на 58% ($p \leq 0,001$). При этом применяемый физический фактор не оказывал влияния на кислородзависимые процессы в нейтрофильных лейкоцитах.

Комбинированное воздействие курса умеренной нормобарической гипоксии и ИМП со специально подобранными характеристиками приводило к достоверному увеличению резервного времени начала судорог в 1,24 раза ($p \leq 0,001$), времени наступления комы в 2,4 раза ($p \leq 0,001$) и 1,6 раза ($p \leq 0,001$) соответственно, а время начала агонии — в 2,9 раза ($p \leq 0,001$). При этом время наступления стадии комы было больше на 14% ($p \leq 0,001$), чем при тренировке нормобарической гипоксии. Данные изменения указывают на выраженное прекодиционирующее действие комбинации факторов (НГГ и ИМП), существенно увеличивающее устойчивость организма к острой гипоксической гипоксии.

При исследовании показателей системы крови получено увеличение уровня гемоглобина на 9% ($p \leq 0,01$) относительно контроля и на 6% ($p \leq 0,05$) от группы НГГ. Увеличи-

лось содержание гемоглобина в эритроците (МСН) на 7% ($p \leq 0,05$) и средняя концентрация гемоглобина в эритроците (МСНС) на 6% ($p \leq 0,05$) по сравнению с контрольным уровнем без изменения количества эритроцитов, что свидетельствует о стимуляции газотранспортной функции крови. Повышение количества ретикулоцитов указывает на стимулирующее действие комбинации факторов на эритропоэз. Рост уровня глутатиона на 5% ($p \leq 0,05$) относительно контроля также указывает на повышение устойчивости животных к гипоксическому воздействию [3]. Уровень вторичного продукта перекисного окисления липидов (МДА) снизился на 10% ($p \leq 0,05$) относительно группы животных, подвергавшихся воздействию умеренной нормобарической гипоксии.

Сочетанное воздействие магнитного поля и умеренной НГГ привело к повышению поглотительной способности и метаболической активности нейтрофилов относительно контрольного уровня. При сравнении данных показателей с группой НГГ получено достоверное снижение фагоцитарной активности нейтрофилов на 16% ($p \leq 0,001$) и фагоцитарного числа на 40% ($p \leq 0,001$). С другой стороны, при проведении спонтанного НСТ-теста получили увеличение процента формазан-положительных клеток на 78% ($p \leq 0,001$). В индуцированном тесте число НСТ-положительных нейтрофилов достоверно больше на 36% ($p \leq 0,001$).

Обсуждение результатов

Обобщение материалов по исследованию комбинированного воздействия экспериментальных факторов показало, что однократное применение ИМП вызывало ряд реакций, направленных, с одной стороны, на компенсацию двухнедельного действия умеренной НГГ, а с другой стороны, на еще большее повышение резервных мощностей организма и устойчивости к экстремальному фактору — острой гипоксии. Известно,

что при комбинации двух факторов, имеющих влияние на одинаковые системы, биологический эффект будет выражен сильнее, чем при комбинации факторов, влияющих на разные системы [9, 24]. По степени чувствительности различных систем организма к действию магнитного поля первое место занимает нервная система [3, 17, 26], стимуляция которой обуславливает адаптационный эффект и к нормобарической гипоксии [2, 11].

Биоэффект, полученный в ходе исследования комбинированного воздействия умеренной нормобарической гипоксической гипоксии и импульсного магнитного поля, выражался в их антигипоксическом прекодиционирующем действии. В результате чего существенно увеличивалась устойчивость организма к воздействию острой гипоксии: отсрочивалось время до наступления миорелаксации на 14% ($p \leq 0,001$) относительно аналогичного показателя при моновоздействии умеренной гипоксии. Совместное применение факторов сопровождалось преимущественно эффектами аддитивизма и характеризовалось более выраженной устойчивостью животных к ОГС по сравнению с их изолированным воздействием. Высокая устойчивость к острой гипоксии обеспечивалась развитием адаптивных гемических сдвигов (ретикулоцитоз, повышение концентрации гемоглобина) и увеличением неспецифической резистентности организма, повышая эффективность неспецифических клеточных механизмов естественной защиты. Повышение содержания гемоглобина в крови приводит

к увеличению скорости транспорта кислорода артериальной кровью, что обеспечивает улучшение снабжения кислородом головного мозга [1]. На адаптивное развитие функциональной активности антиоксидантной системы указывало и достоверное увеличение в эритроцитах концентрации восстановленного глутатиона. По анализу результатов изменения состояния системы ПОЛ можно говорить, что импульсное магнитное поле нивелировало эффект повышения пероксидации в сыворотке крови, вызываемый действием НГГ.

Выводы

1. Курс умеренной нормобарической гипоксической гипоксии вызывает в организме крыс формирование структурного следа адаптации, что определяет прекодиционирующий антигипоксический эффект при воздействии острой гипоксической гипоксии.
2. Однократное применение низкочастотного импульсного магнитного поля с индукцией от 1,5 до 3,2 мТл в выбранных режимах вызывает защитно-компенсаторные реакции в организме крыс, что выражается в увеличении содержания ретикулоцитов, активации антиоксидантной системы и стимуляции клеточного звена иммунитета.
3. Совместное применение курса умеренной нормобарической гипоксической гипоксии и импульсного магнитного поля сопровождается преимущественно эффектами аддитивности и характеризуется повышением неспецифической резистентности крыс к острой гипоксической гипоксии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Абазова З.Х., Колчинская А.З., Кумыков В.К., Хацуков Б.Х. Интервальная гипоксическая тренировка в курсе лечения миопии. *Вестник новых медицинских технологий*. 2000;VII(2):87–89. [Abazova Z.Kh., Kolchinskaya A.Z., Kумыkov V.K., Khat-sukov B.Kh. Interval'naya gipoksicheskaya trenirovka v kurse lecheniya miopii [Interval hypoxic training in the treatment of myopia]. *Vestnik novykh meditsin-skikh tekhnologij* [Bulletin of new medical technologies]. 2000;VII(2):87–89. (In Russian)].
2. Айдаралиев А.А. Физиологические механизмы адаптации и пути повышения резистентности организма к гипоксии. Фрунзе: Илим, 1978. 190 с. [Ajdaraliev A.A. *Fiziologicheskie mekhanizmy adaptacii i puti povysheniya rezistentnosti organizma k gipoksii* [Physiological mechanisms of adaptation

- and ways to increase the body's resistance to hypoxia].* Frunze: Pym, 1978. 190 p. (In Russian)].
- Айрацетян С.Н., Айрацетян Г.С., Саркисян М.А. О механизмах действия электромагнитных волн низкой частоты (ЭМВ НЧ) на вибрацию клетки. В кн.: *Электромагнитные поля и здоровье человека. Функциональные и прикладные исследования: Мат-лы III Межд. конф. М., 2002. С. 32.* [Ajratsetyan S.N., Ajratsetyan G.S., Sarkisyan M.A. O mekhanizmah dejstviya elektromagnitnykh voln nizkoj chastoty (EMV NCh) na vibraciju kletki [On the mechanisms of action of low frequency electromagnetic waves (EMW LF) on cell vibration]. *V kn.: Elektromagnitnye polya i zdorov'e cheloveka. Funkcionalnye i prikladnye issledovaniya: Mat-ly III Mezhd. konf. [In the book: Electromagnetic fields and human health. Functional and applied research: Materials of the III International Conference].* Moscow, 2002. P. 32. (In Russian)].
 - Байбурина Г.А., Нургалева Е.А., Шибкова Д.З., Башкатов С.А. Процессы липопероксидации в почках после ишемии-реперфузии у крыс с различной устойчивостью к гипоксии. *Фундаментальные исследования.* 2015;(2 ч. 8):1694–98. [Bajburina G.A., Nurgaleeva E.A., Shibkova D.Z., Bashkatov S.A. Processy lipoperoksidacii v pochkah posle ishemii-reperfuзии u krys s razlichnoj ustojchivost'yu k gipoksii [Processes of lipid peroxidation in the kidney after ischemia-reperfusion in rats with different resistance to hypoxia]. *Fundamental'nye issledovaniya [Basic research].* 2015;(2 Pt. 8):1694–98. (In Russian)].
 - Белявский Н.Н., Кузнецов В.И., Лихачев С.А. Использование интервальной нормобарической гипокситерапии для лечения и профилактики транзиторных церебральных ишемических атак. *Медицинские новости.* 2006;(6):54–57. [Belyavskij N.N., Kuznetsov V.I., Likhachev S.A. Ispol'zovanie interval'noj normobaricheskoj gipoksiterapii dlya lecheniya i profilaktiki tranzitornykh tserebral'nykh ishemicheskikh atak [The use of interval normobaric hypoxotherapy for the treatment and prevention of transient cerebral ischemic attacks]. *Meditsinskie novosti [Medical news].* 2006;(6):54–57. (In Russian)].
 - Братик А.В., Цыганова Т.Н. Возможности применения нормобарической интервальной гипоксической тренировки в восстановительной коррекции постмастэктомического синдрома. *Вестник новых медицинских технологий.* 2013;XX(1):80. [Bratik A.V., Tsyganova T.N. Vozможности primeneniya normobaricheskoj interval'noj gipoksicheskoj trenirovki v vosstanovitel'noj korrektsii postmastektomicheskogo sindroma [The possibilities of using normobaric interval hypoxic training in the restorative correction of postmastectomy syndrome]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologij [Bulletin of new medical technologies].* 2013;XX(1):80. (In Russian)].
 - Глазачев О.С., Ткачук Е.Н., Бадиков В.И., Федянина Н.Г., Эль-Ямани М.Н. Влияние гипоксических тренировок на здоровье школьников, проживающих в экологически неблагоприятных регионах. *Физиология человека.* 1996;22(1):88–93. [Glazachev O.S., Tkachuk E.N., Badikov V.I., Fedyanina N.G., El-Yamani M.N. Vliyanie gipoksicheskikh trenirovok na zdorov'e shkol'nikov, prozhivayushchikh v ekologicheskii neblagopriyatnykh regionakh [The effect of hypoxic training on the health of schoolchildren living in ecologically unfavorable regions]. *Fiziologiya cheloveka [Human physiology].* 1996;22(1):88–93. (In Russian)].
 - Гланц С.М. *Медико-биологическая статистика: Практика.* М.: Наука, 1999. 459 с. [Glants S.M. *Mediko-biologicheskaya statistika: Praktika [Biomedical statistics: Practice].* Moscow: Nauka, 1999. 459 p. (In Russian)].
 - Даренская Н.Г., Короткевич А.О. *Неспецифическая реактивность организма и принципы формирования индивидуальной резистентности.* М., 2001. 240 с. [Darenkaya N.G., Korotkevich A.O. *Nespetsificheskaya reaktivnost' organizma i printsipy formirovaniya individual'noj rezistentnosti [Non-specific reactivity of the organism and the principles of the formation of individual resistance].* Moscow, 2001. 240 p. (In Russian)].
 - Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Станкова Н.В., Ревякин А.О., Матвеев Е.Л., Костогрызова Р.Г., Люблинский С.Л., Колышев И.Ю., Берзин И.А. Экспериментальная оценка адаптогенной активности новых лекарственных средств и веществ с использованием крупных лабораторных животных. *Биомедицина.* 2012;(4):49–58. [Karkishchenko V.N., Kapanadze G.D., Stankova N.V., Revyakin A.O., Matveyenko E.L., Kostogryzova R.G., Lyublinskiy S.L., Kolyshev I.Yu., Berzin I.A. Eksperimental'naya otsenka adaptogennoj aktivnosti novykh lekarstvennykh sredstv i veshchestv s ispol'zovaniem krupnykh laboratornykh zhivotnykh. *Biomeditsina.* 2012;(4):49–58. [Karkishchenko V.N., Kapanadze G.D., Stankova N.V., Revyakin A.O., Matveyenko E.L., Kostogryzova R.G., Lyublinskiy S.L., Kolyshev I.Yu., Berzin I.A. Eksperimental'naya otsenka adaptogennoj aktivnosti novykh lekarstvennykh sredstv i veshchestv s ispol'zovaniem krupnykh laboratornykh zhivotnykh [Experimental evaluation of adaptogenic activity of new drugs and substances using large laboratory animals]. *Biomedicine.* 2012;(4):49–58. (In Russian)].
 - Колчинская А.З. *Кислород. Физическое состояние, работоспособность.* Киев: Наукова Думка, 1991. 205 с. [Kolchinskaya A.Z. *Kislород. Fizicheskoe sostoyanie, rabotosposobnost' [Oxygen. Physical condition, performance].* Kiev: Naukova Dumka, 1991. 205 p. (In Russian)].
 - Крылов В.Н., Лобкаева Е.П., Ошевенский Л.В., Лабынцева О.М., Захарова О.А., Федотов В.Н., Ананьева Ю.Е., Рохмистрова Е.Г. Возможность применения импульсного магнитного поля в качестве протектора повреждающего действия гипоксии. *Биомедицина.* 2018;(3):90–100. [Krylov V.N., Lobkaeva E.P., Oshevenskiy L.V., Labyntseva O.M., Zakharova O.A., Fedotov V.N., Anan'eva Yu.E., Rokhmistrova E.G. Vozможnost' primeneniya impul'snogo magnitnogo polya v kachestve protektora povrezhdayushchego dejstviya gipoksii [The possibility of using a pulsed magnetic field as a protector of the damaging effect of hypoxia]. *Biomedicine.* 2018;3:90–100. (In Russian)].

13. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel*. Киев: Морион, 2000. 319 с. [Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. *Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispol'zovaniem Excel* [Statistical methods in biomedical research using Excel]. Kiev: Morion, 2000. 319 p. (In Russian)].
14. Малкин В.Б., Гиппенрейтер Е.Б. *Острая и хроническая гипоксия*. М.: Наука, 1979. 240 с. [Malkin V.B., Gippenreiter E.B. *Ostraya i khronicheskaya gipoksiya* [Acute and chronic hypoxia]. Moscow: Nauka, 1979. 240 p. (In Russian)].
15. *Медицинские лабораторные технологии: Справ., Т.2* / Под ред. А.И. Карпищенко. СПб.: Интермедика, 1999. 512 с. [Meditsinskie laboratornye tekhnologii: Sprav., T. 2. [Medical laboratory technologies: Handbook, Vol. 2]. Ed. by Karpishchenko A.I. Saint-Petersburg: Intermedika, 1999. 512 p. (In Russian)].
16. Меерсон Ф.З. *Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации*. М.: ГипоксИАл Medical Ltd, 1993. 331 с. [Meerson F.Z. *Adaptatsionnaya meditsina: mekhanizmy i zashchitnyye efekty adaptatsii* [Adaptive medicine: mechanisms and protective effects of adaptation]. Moscow: Hypoxial Medical Ltd, 1993. 331 p. (In Russian)].
17. Меркулова Л.М. Морфофункциональные реакции нервной ткани на воздействие импульсного магнитного поля (ИМП). В кн.: *Влияние электромагнитных полей на организм человека: сб. науч. ст.* М.: Фонд «Новое тысячелетие», 1998. С. 94–119. [Merkulova L.M. Morfofunktsional'nye reaktсии nervnoy tkani na vozdeystvie impul'snogo magnitnogo polya (IMP) [Morphofunctional reactions of the nervous tissue to the effects of a pulsed magnetic field (PMF)]. V kn.: *Vliyaniye elektromagnitnykh poley na organizm cheloveka: sb. nauch. st.* [In the book: The influence of electromagnetic fields on the human body: a collection of scientific articles]. Moscow: Fond "Novoe tysyacheletie", 1998. Pp. 94–119. (In Russian)].
18. Николаева А.Г. *Использование адаптации к гипоксии в медицине и спорте*. Витебск: ВГМУ, 2015. 150 с. [Nikolaeva A.G. *Ispol'zovanie adaptatsii k gipoksii v meditsine i sporte* [The use of adaptation to hypoxia in medicine and sports]. Vitebsk: VGMU Publ., 2015. 150 p. (In Russian)].
19. *Прерывистая нормобарическая гипоксотерапия в гинекологии, акушерстве и педиатрии: Метод. реком. № 23 Комитета здравоохранения г. Москвы*, 2002. [Preryvistaya normobaricheskaya gipoksoterapiya v genikologii, akusherstve i pediatrii: Metod. rekom. № 23 Komiteta zdoravoohraneniya g. Moskvy [Intermittent normobaric hypoxotherapy in gynecology, obstetrics and pediatrics: Guidelines No. 23 of the Moscow Healthcare Committee]. Moscow, 2002. (In Russian)].
20. Разолов Н.А., Чижов А.Я., Потиевский Б.Г., Потиевская В.И. *Нормобарическая гипоксотерапия: метод. реком. для авиационных врачей*. М., 2002. 19 с. [Razolov N.A., Chizhov A.Ya., Potievskij B.G., Potievskaya V.I. *Normobaricheskaya gipoksoterapiya: metod. rekom. dlya aviatsionnykh vrachej* [Normobaric hypoxotherapy: guidelines for aviation doctors]. Moscow, 2002. 19 p. (In Russian)].
21. Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Степанова О.И., Казакова Л.Х., Ревякин А.О., Касинская Н.В., Матвеев Е.Л., Денгына С.Е., Фокин Ю.В. Влияние препаратов пептидного происхождения и их комбинаций на устойчивость крыс к острой гипобарической гипоксии. *Биомедицина*. 2012;(4):45–48. [Semenov Kh.Kh., Karkisichenko N.N., Karkisichenko V.N., Kapanadze G.D., Stepanova O.I., Kazakova L.Kh., Revyakin A.O., Kasinskaya N.V., Matveyenko E.L., Den'gina S.E., Fokin Yu.V. Vliyaniye preparatov peptidnogo proiskhozhdeniya i ikh kombinatsij na ustojchivost' krysa k ostroj gipobaricheskoy gipoksii [The influence of drugs of peptide origin and their combinations on the resistance of rats to acute hypobaric hypoxia]. *Biomedicine*. 2012;4:45–48. (In Russian)].
22. Сидякин В.Г., Сташков А.М., Янова Н.П. Адаптационные реакции организма, индуцированные действием слабых магнитных полей крайне низкой частоты (КНЧ). *Ученые записки Симферопольского университета*. 1996;(2):158–163. [Sidyakin V.G., Stashkov A.M., Yanova N.P. Adaptatsionnyye reaktсии organizma inducirovannyye dejstviem slabnykh magnitnykh poley krajne nizkoj chastoty (KNCh) [Adaptive reactions of the body, induced by the action of weak magnetic fields of extremely low frequency (ELF)]. *Uchenye zapiski Simferopol'skogo universiteta* [Scientific notes of the Simferopol University]. 1996;(2):158–163. (In Russian)].
23. Солодков А.С., Гананольский В.П., Ятманов А.Н., Шабанов П.Д., Лопатина В.Ф. Фармакологические препараты, способствующие ускорению адаптации спортсменов в условиях горной местности. *Ученые записки*. 2014;(11):142–148. [Solodkov A.S., Ganapol'skij V.P., Yatmanov A.N., Shabanov P.D., Lopatina V.F. Farmakologicheskie preparaty, sposobstvuyushchie uskoreniyu adaptatsii sportsmenov v usloviyakh gornoj mestnosti [Pharmacological agents that accelerate the adaptation of athletes in the highlands]. *Uchenye zapiski* [Scholarly notes]. 2014;(11):142–148. (In Russian)].
24. Ушаков И.Б. *Комбинированные воздействия в экологии человека и экстремальной медицины*. М.: ИПЦ «Издательство», 2003. 442 с. [Ushakov I.B. *Kombinirovannyye vozdeystviya v ekologii cheloveka i ekstremal'noj meditsiny* [Combined effects in human ecology and extreme medicine]. Moscow: IPTs "Izdattsentr", 2003. 442 p. (In Russian)].
25. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х. Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств. *Биомедицина*.

- 2013;(4):149–157. [Shustov E.B., Karkischenko N.N., Karkischenko V.N., Semenov Kh.Kh. Analiz parametrov individual'noj ustojchivosti laboratornykh zhivotnykh k гипоксии v interesakh biologicheskogo modelirovaniya nejroprotektornogo i antigипоксического dejstviya lekarstvennykh sredstv [Analysis of the parameters of individual resistance of laboratory animals to hypoxia in the interests of biological modeling of the neuroprotective and antihypoxic effects of drugs]. *Biomedicine*. 2013;(4):149–157. (In Russian)].
26. Эйди У.Р. Кооперативные механизмы восприимчивости мозговой ткани к внешним и внутренним электрическим полям. *Физиология человека*. 1975;1:59–68. [Ejdi U.R. Kooperativnyye mekhanizmy vospriimchivosti mozgovoj tkani k vneshnim i vnutrennim elektricheskim polyam [Cooperative mechanisms of susceptibility of brain tissue to external and internal electric fields]. *Fiziologiya cheloveka [Human physiology]*. 1975;1:59–68. (In Russian)].
27. Яремчук Г.Н., Ревенко С.Н. Метод реабилитации лиц, пострадавших в результате аварии на Чернобыльской АЭС. В кн.: *Традиционные и нетрадиционные методы оздоровления детей: Тез. докл. 6 Межд. конф.* Смоленск, 1997. С. 251. [Yaremchuk G.N., Revenko S.N. Metod reabilitatsii lits, postradavshikh v rezul'tate avarii na Chernobyl'skoj AES [Method of rehabilitation of persons affected by the accident at the Chernobyl nuclear power plant]. *V kn.: Traditsionnye i netraditsionnye metody ozdorovleniya detej: Tез. dokl. 6 Mezhd. konf.* [In the book: Traditional and non-traditional methods of children's health: Tез. report 6 Int. conf.]. Smolensk, 1997. P. 251. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

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

Рохмистрова Елена Геннадьевна, ФГУП «Российский Федеральный ядерный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики»;
e-mail: rohmis@mail.ru

Лобкаева Евгения Петровна, д.б.н., проф., ФГУП «Российский Федеральный ядерный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики»;
e-mail: olga@bfrc.vniief.ru

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

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

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

Elena G. Rokhmistrova, Russian Federal Nuclear Center — All-Russian Research Institute of Experimental Physics;
e-mail: rohmis@mail.ru

Yevgeniya P. Lobkayeva, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Russian Federal Nuclear Center — All-Russian Research Institute of Experimental Physics;
e-mail: olga@bfrc.vniief.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

А. А. Мохов^{1,*}, А. А. Чапленко^{2,4}, А. Н. Яворский³

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный юридический университет им. О. Е. Кутафина (МГЮА)»
123286, Российская Федерация, Москва, ул. Садовая-Кудринская, д. 9

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова»
119991, Российская Федерация, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3

³ ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»
142290, Российская Федерация, Московская обл., г. Пушкино, пр-т Науки, д. 3

⁴ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России
127051, Российская Федерация, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2

В настоящее время для редактирования клеточного генома используют технологии, основанные на применении, как правило, одного из трех классов нуклеаз — цинкового пальца, TAL или CRISPR-Cas. Все они не лишены недостатков, некритичных при использовании у животных и в опытах *in vitro*, но значительно сдерживающих редактирование генома человека. На данный момент накоплен значительный опыт применения геноморедактирующих технологий для лечения и профилактики генетических заболеваний, трансмиссивных и вирусных инфекций, однако дальнейшее развитие сдерживают как технические, так и этические проблемы. Задача экспертного сообщества и государства — обеспечить плавную интеграцию методов геномного редактирования в жизнь общества, не допустив значительных социальных потрясений.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR-Cas, биоэтика, генный драйв

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Статья подготовлена при финансовой поддержке РФФИ НИР «Правовое регулирование геномных исследований и внедрение их результатов в медицинской практике» (18-29-14063/18).

Для цитирования: Мохов А. А., Чапленко А. А., Яворский А. Н. Использование технологий геномного редактирования: достижения и перспективы. *Биомедицина*. 2019;15(2):34–42. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-34-42>

Поступила 03.04.2019

Принята после доработки 24.05.2019

Опубликована 10.06.2019

USE OF GENOME EDITING TECHNOLOGIES: ACHIEVEMENTS AND FUTURE PROSPECTS

Alexander A. Mokhov^{1,*}, Alexander A. Chaplenko^{2,4}, Alexander N. Yavorskiy³

¹ Kutafin Moscow State Law University (MSAL)
123286, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-Kudrinskaya str., 9

² Lomonosov Moscow State University
119991, Russian Federation, Moscow, Leninskie gory str., 1, building 3

³ Pushchino State Institute of Natural Science
142290, Russian Federation, Moscow region, Pushchino, Nauki ave., 3

⁴ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products
127051, Russian Federation, Moscow, Petrovsky blvd, 8/2

Genome editing technologies are currently based on the use of one from the three classes of nucleases, i.e. a zinc finger, TAL or CRISPR-Cas. Drawbacks inherent in each of these approaches, though not being critical for animal or *in vitro* experiments, significantly limit their application in human genome editing. Considerable experience has so far been accumulated in the field of using gene-editing technologies for the treatment and prevention of genetic diseases, transmissible and viral infections. However, further progress is hampered by various technical and ethical problems. It is the task of expert communities and the state that genomic editing methods be smoothly integrated into everyday practices without significant social upheavals.

Keywords: genome editing, CRISPR-Cas, bioethics, gene drive

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

Funding: The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, “Legal regulation of genomic research and implementation of its results in clinical practice” (18-29-14063/18).

For citation: Mokhov A.A., Chaplenko A.A., Yavorskiy A.N. Use of Genome Editing Technologies: Achievements and Future Prospects. *Journal Biomed.* 2019;15(2):34–42. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-34-42>

Submitted 03.04.2019

Revised 24.05.2019

Published 10.06.2019

Введение

В основе высокоэффективного редактирования генома лежит возможность реализации точно направленного двухцепочечного разрыва ДНК в интересующей хромосомной последовательности. Многочисленные неспецифические разрывы двойной цепи ДНК происходят в ходе естественного процесса мейоза [1] или могут быть искусственно вызваны ионизирующим излучением [2]. Дальнейшие процессы репарации могут происходить с использованием одного из двух основных механизмов: нехомологичного соединения концов (НСК) или гомологической рекомбинации (ГР) [3–6]. В ходе НСК происходит лигирование концов ДНК с минимальной ферментной обработкой в сайте соединения концов, в то время как при ГР в качестве репарационной матрицы, как правило, используется неповрежденная гомологичная последовательность сестринской хроматиды.

В модельных экспериментах с высокоспецифическими нуклеазами была показана стимуляция как НСК, так и ГР в клетках дрожжей и млекопитающих и, таким образом, был получен путь к программируемому редактированию генома [7–11]. Иногда в ходе репарации методом НСК

происходят ошибки, что приводит к небольшим локальным инсерциям и делециям. Данные мутации могут вызывать инактивацию редактируемого гена.

В настоящее время в молекулярной биологии используют три мощных класса нуклеаз, которые могут быть запрограммированы на получение двойных разрывов по существу в любой желаемой мишени: нуклеазы цинкового пальца, транскрипционные активатор-подобные эффекторные нуклеазы (TAL нуклеазы) и CRISPR-Cas нуклеазы [12, 13]. В настоящее время именно CRISPR-Cas доминирует в исследовательских лабораториях по всему миру, поскольку остальные методы менее эффективны, более затратны и трудоемки [14]. Однако все вышеописанные способы были обнаружены в ходе исследований естественных биологических процессов, а не в процессе поиска инструментов для редактирования генома, что в очередной раз показывает, как сильно влияет фактор случайности на развитие современной науки.

Ограничения современных методов редактирования генома

Примечательно, что все геном-редактирующие нуклеазы по сути всего лишь

производят двухцепочечный разрыв хромосомной ДНК. Главный критерий эффективности — специфичность платформы редактирования к четко обозначенному участку генома и отсутствие разрывов в остальных локусах. Однако все, что происходит после разрыва, определяется механизмом репарации клеточной ДНК, два варианта которой были описаны ранее. Большинство соматических клеток у высших эукариот запускают процесс НСК с сопутствующим возникновением инсерций и делеций чаще, чем копируют последовательности от предоставленной донорной ДНК. Это приемлемо, если цель редактирования — нокаут гена или комплекса генов, но значительно ограничивает возможности введения собственных нуклеотидных последовательностей. В исследованиях [15, 16] был достигнут ограниченный успех в модулировании соотношения между целевым и мутантным продуктом, но пока универсальное решение не найдено, и для некоторых типов клеток НСК остается наиболее часто реализуемым способом репарации. Несколько недавних сообщений показывают, что низкомолекулярные ингибиторы ключевых ферментов процесса НСК могут быть эффективными [17–19], но необходимы дополнительные исследования для создания более надежных реагентов. Другим способом влияния на эффективность вставки целевого гена является модификация донорной молекулы ДНК [20], связь донорной последовательности с направляющей РНК [21] и использование естественных механизмов для вставки нужных фрагментов [22, 23].

С другой стороны, все платформы ДНК-редактирования обладают высокой, но ограниченной специфичностью. В одном из последних исследований показана возможность увеличения специфичности CRISPR-Cas путем модуляции белка Cas9 и направляющей РНК. Насколько важна абсолютная специфичность системы редактирования, а также отсутствие мутагенного

потенциала, зависит от сферы применения. Во многих модельных организмах существуют способы предотвращения экспрессии мутантного гена, например, путем его нокаута и замены геном дикого типа. На данные механизмы можно положиться при редактировании генома растительных или бактериальных клеток, а также при создании гуманизированных моделей животных для фармакологических исследований [24]. Даже в некоторых медицинских применениях нецелевые мутации могут быть допустимыми, если они не приводят к возникновению заболеваний, однако данный аспект является наиболее этически уязвимым [25].

Разработка новых платформ редактирования генома

Можно с уверенностью сказать, что редактирование генома будет оставаться широко используемым инструментом как в научных исследованиях, так и в коммерческой и медицинской сфере. Возникает вопрос: является ли CRISPR-Cas последним словом в программируемых нуклеазах, или, возможно, на горизонте есть что-то лучше? На данный момент трудно представить систему, которая существенно проще, чем распознавание гена комплементарной матрицей и расщепление одним белком. Возможно, белок может быть меньше и обладать дополнительными полезными свойствами, но все это вариации на одну и ту же тему, а не нечто совершенно новое. Возможна разработка химической системы, основанной на низкомолекулярных синтетических соединениях, сочетающих распознавание ДНК с ее расщеплением. Исследования, направленные на достижение этой цели, продолжаются десятилетиями — от триплекс-образующих олигонуклеотидов [26] до пептидных нуклеиновых кислот [27] и полииминов [28], — но до создания платформы с адекватной эффективностью расщепления и диапазоном распознавания еще очень далеко. Похоже, что новые методы редактирования генома, если и будут созданы,

обнаружатся в ходе исследований естественных процессов, а не в процессе улучшения техники CRISPR. Вариантом разрыв-индуцированного редактирования генома является CRISPR-опосредованное редактирование азотистых оснований [29–32]. В данной технологии используют ни разу Cas9, которая редактирует лишь одну нить целевой ДНК, при этом получают не разрезанную, а надрезанную ДНК. Преобразование цитизина в урацил в пределах нескольких пар оснований, ближайших к сайту связывания, определяемому РНК, приводит к изменениям экспрессии в этой очень узкой области. Будущее использование этого подхода может включать в т. ч. модификацию отдельных аллелей генов человека.

Применение технологий редактирования генома в медицине

На данный момент описано большое число попыток использования генного редактирования в клинической практике. FDA одобрило ряд клинических исследований, включающих редактирование генома соматических клеток для клинических испытаний фазы I. В самых ранних исследованиях использовали нуклеазы цинкового пальца для нокаута гена рецептора CCR5 в Т-лимфоцитах ВИЧ-положительных пациентов [33], данная модификация делает Т-клетки устойчивыми к вирусу. В дальнейшем планируется редактировать геном клеток-предшественниц лимфоцитов, что может повысить эффективность терапии.

TAL-нуклеазы были использованы для повышения эффективности терапии CAR-T клетками [34], кроме того, для этой цели были одобрены два исследования с использованием CRISPR-Cas9 [35, 36]. Эти примеры основаны на редактировании генома клеток, предварительно выделенных из организма с последующим введением тому же пациенту, у которого был произведен забор (аутологичные биомедицинские клеточные продукты).

Такие процедуры *ex vivo* обеспечивают легкую доставку редактирующих систем в клетки, а также возможность и предварительную характеристику отредактированных клеток. По мере развития методов клеточной терапии редактирование генома будет становиться неотъемлемым их дополнением. В частности, из популяции соматических клеток индивидуума могут быть выделены стволовые клетки, путем редактирования генома которых *ex vivo* и последующего введения может быть изменен фенотип всего органа или ткани.

Во многих случаях клеточная терапия невозможна (например, невозможно выделить все или хотя бы большую часть целевых клеток). В настоящее время ведутся клинические испытания средств для лечения гемофилии и лизосомных болезней накопления, основанные на доставке нуклеаз цинкового пальца *in vivo* вирусными векторами. Таким образом осуществляют редактирование генома гепатоцитов, которые относят к типу клеток, легко доступных для внедрения. Доставка в клетки других органов *in vivo* потребует создания новых векторных и не векторных подходов и, возможно, создания специфических линий генномодифицированных стволовых клеток. Активные исследования направлены на лечение и других генетических заболеваний, включая серповидноклеточную анемию и миодистрофию. Как и для любых средств медицинского применения, для систем геномного редактирования должна быть доказана эффективность и безопасность.

Еще одним применением геном-редактирующих технологий, косвенно связанным с медициной, является создание трансгенных животных-моделей, имитирующих то или иное патологическое состояние, с целью использования в доклинических испытаниях лекарственных препаратов. В исследованиях [37–41] был достигнут значительный прогресс в создании генно-

модифицированных мышей с введенными человеческими генами NAT1 и NAT2.

Редактирование генома эмбриона человека

По причине легкости редактирования генома с использованием платформы CRISPR и, соответственно, широких возможностей злоупотребления технологией существует значительный интерес к перспективам редактирования генома эмбриона человека. Основной метод применения — доставка редактирующих агентов в клетки эмбриона, созданного путем оплодотворения *in vitro*. В будущем может оказаться более целесообразным и этически приемлемым редактировать гаметогенные клетки-предшественники у будущих родителей. Преимущество зародышевой коррекции аллелей генов, соответствующих патологическим состояниям, заключается в том, что они навсегда исчезнут из генома. Однако существует риск того, что попытка исправить генетический код неродившегося ребенка может принести больше вреда, чем пользы. Современная технология редактирования генома не обладает достаточной эффективностью и специфичностью, чтобы полностью гарантировать безопасность. Мутации, возникающие в нецелевых локусах хромосом вследствие введения редактирующих конструкций, могут влиять на организм ребенка и передаваться из поколения в поколение, а их эффекты не всегда будут доброкачественными, предсказуемыми или обратимыми.

Продолжающиеся исследования сделают редактирование генома эмбриона более безопасным и более эффективным, и кажется неизбежным, что оно в конечном итоге будет широко использоваться. В то же время важно проводить обсуждение этических вопросов, связанных с такими технологиями [42]. Экспертами в области биоэтики был представлен подробный обзор практических трудностей редактирования генома эмбриона человека [43].

Применение технологий редактирования генома для профилактики трансмиссивных инфекций

Другое применение редактирования генома, которое стало привлекать внимание в последние несколько лет, — использование его в генетическом процессе, называемом геномным драйвом. В основе данного процесса — законы генетики, согласно которым искусственно введенный одному или нескольким представителям ген может довольно быстро распространиться и изменить геном всей популяции, причем даже в том случае, если признаки, кодируемые этим геном, умеренно пагубные для организма. Естественные драйвы генов уже были обнаружены, но текущий интерес сосредоточен на тех, которые опосредованы CRISPR-Cas9 [44]. Синтетический геномный драйв был предложен для уничтожения комаров, переносящих тропические болезни (прежде всего, малярию и желтую лихорадку). К примеру, искусственно вводили гены стерильности самок [45] и гены, кодирующие факторы, замедляющие рост паразита — малярийного плазмодия [46]. Данные подходы могут значительно сократить распространение болезни в районах, где ее лечение весьма трудно организовать. Значительная тяжесть и распространенность заболеваний, передающихся комарами, особенно в развивающихся странах, подталкивают исследователей к реализации вышеописанных идей. С другой стороны, перспектива намеренного или даже непреднамеренного влияния на генетический профиль целого вида живых организмов вызывает озабоченность в обществе [47, 48]. Очень трудно предсказать последствия удаления одного из звеньев экосистемы. Если какая-то популяция комаров исчезнет, каково будет воздействие на виды, взаимодействующие с ней, — растения, рыбы, птицы? Другие виды скоро заполнят свободную нишу, но будут ли они оказывать такое же влияние на их окружение? Станет

ли драйв неэффективным из-за естественных механизмов адаптации? Также разрабатывается обратимый генный драйв [45], но его эффективность пока не оценивалась. К сожалению, маломасштабные лабораторные тесты не способны предсказать результаты применения генного драйва в естественной среде, поэтому до тех пор, пока такие технологии не будут реализованы, соотношение пользы и вреда для них будет неизвестным.

Заключение

Параллельно с решением методологических задач, связанных с технологиями редактирования генома, важно рассмотреть и социальные проблемы, связанные, прежде всего, с медицинским применением таких платформ. Кто должен решать, какие продукты или методы лечения могут быть разработаны, а какие должны быть запрещены? Возможно ли добровольное согласие на участие в исследованиях с высоким риском для жизни? Какие состояния могут

быть скорректированы генной терапией? Очевидно, такие тяжелые болезни, как хоррея Гентингтона или мышечная дистрофия, должны быть побеждены при наличии возможности. А как быть с наследственной глухотой или карликовостью? Люди с подобными признаками часто являются полноценными членами общества и не чувствуют себя нуждающимися в «коррекции» [49]. Методы лечения, основанные на редактировании генома, в настоящее время сложны и дороги. Будут ли они доступны только богатым слоям населения?

Каждый день методы редактирования генома улучшаются и развиваются, повышается их безопасность и эффективность. Использование подобных платформ — дело ближайшего будущего, которое станет неотъемлемой частью жизни человека в XXI веке. Задача экспертного сообщества и государства — обеспечить плавную интеграцию столь этически неоднозначных технологий в жизнь общества, не допустив значительных социальных потрясений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Youds J.L., Boulton S.J. The choice in meiosis — defining the factors that influence crossover or non-crossover formation. *J. Cell Sci.* 2011;(124 Pt 4):501–513.
2. Latt S.A. Sister chromatic exchange formation. *Annual Rev. Genet.* 1981;(15):11–55.
3. Ferguson D., Sekiguchi J., Chang S., et al. The non-homologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2000;97(12):6630–33.
4. Iliakis G., Wu W., Wang M., et al. Backup pathways of nonhomologous end joining may have a dominant role in the formation of chromosome aberrations. In: Obe G., et al. (eds). *Chromosomal Alterations*. Berlin: Springer Verlag, 2007. Pp. 67–85.
5. Mills K., Ferguson D., Alt F. The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immun. Rev.* 2003;(194):77–95.
6. Schwartz M., Zlotorynski E., Goldberg M., et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes Dev.* 2005;19:2715–26.
7. Choulika A., Perrin A., Dujon B., Nicolas J.F. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 1995;(15):196–73.
8. Plessis A., Perrin A., Haber J.E., Dujon B. Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics.* 1992;(130):451–460.
9. Rouet P., Smih F., Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol. Cell Biol.* 1994;(14):8096–8106.
10. Rudin N., Sugarman E., Haber J.E. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1989;(122):519–534.
11. Chapman J.R., Taylor M.R., Boulton S.J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell.* 2012;47(4):497–510.
12. Carroll D. Genome Engineering with Targetable Nucleases. *Annu Rev. Biochem.* 2014;(83):409–439.
13. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas — инструменты открытий. *ACTA NATURAE.* 2014;6(3):20–42. [Nemudryj A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakiyan S.M. Sis-

- temy redaktirovaniya genomov TALEN i CRISPR/Cas — instrumenty otkrytij [TALEN and CRISPR / Cas genome editing systems — discovery tools]. *ACTA NATURAE*. 2014;6(3):20–42. (In Russian)].
14. Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н., Серова И.А., Фишман В.С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(6):930–944. DOI: 10.18699/VJ16.214. [Menzorov A.G., Luk'yanchikova V.A., Korablev A.N., Serova I.A., Fishman V.S. Prakticheskoe rukovodstvo po redaktirovaniyu genomov sistemoy CRISPR/Cas9 [A practical guide to editing genomes with CRISPR / Cas9]. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selektsii [J. of Genetics and Vavilov selection]*. 2016;20(6):930–944. DOI: 10.18699/VJ16.214. (In Russian)].
 15. Beumer K.J., Trautman J.K., Bozas A., Liu J.L., Rutter J., Gall J.G., et al. Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;(105):19821–26.
 16. Bozas A., Beumer K.J., Trautman J.K., Carroll D. Genetic analysis of zinc-finger nuclease-induced gene targeting in *Drosophila*. *Genetics*. Forthcoming. 2009.
 17. Chu V.T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S., Rajewsky K., et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(5):543–548.
 18. Maruyama T., Dougan S.K., Truttmann M.C., Bilate A.M., Ingram J.R., Ploegh H.L. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(5):538–542.
 19. Singh P., Schimenti J.C., Bolcun-Filas E. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*. 2015;199(1):1–15.
 20. Richardson C.D., Ray G.J., DeWitt M.A., Curie G.L., Corn J.E. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(3):339–344.
 21. Lee K., Mackley V.A., Rao A., Chong A.T., DeWitt M.A., Corn J.E., et al. Synthetically modified guide RNA and donor DNA are a versatile platform for CRISPR-Cas9 engineering. *eLife*. 2017.
 22. Paix A., Folkmann A., Seydoux G. Precision genome editing using CRISPR-Cas9 and linear repair templates in *C. elegans*. *Methods*. 2017.
 23. Sakuma T., Nakade S., Sakane Y., Suzuki K.T., Yamamoto T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat. Protoc.* 2016;11(1):118–133.
 24. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Колоскова Е.М., Каркищенко В.Н. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;(3):4–22. [Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Koloskova E.M., Karkischenko V.N. Sozdanie humanizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhii, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological studies (successes, failures and prospects)]. *Bio-medicine*. 2014;(3):4–22. (In Russian)].
 25. Tycko J., Myer V.E., Hsu P.D. Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Mol. Cell*. 2016;63(3):355–370.
 26. Chin J.Y., Glazer P.M. Repair of DNA lesions associated with triplex-forming oligonucleotides. *Mol. Carcinog.* 2009;(48):389–399.
 27. Kim K.H., Nielsen P.E., Glazer P.M. Site-specific gene modification by PNAs conjugated to psoralen. *Biochemistry*. 2006;(45):314–323.
 28. Doss R.M., Marques M.A., Foister S., Chenoweth D.M., Dervan P.B. Programmable oligomers for minor groove DNA recognition. *J. Am. Chem. Soc.* 2006;(128):9074–79.
 29. Hess G.T., Fresard L., Han K., Lee C.H., Li A., Cimprich K.A., et al. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nat. Methods*. 2016;13(12):1036–42.
 30. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016;533(7603):420–424.
 31. Ma Y., Zhang J., Yin W., Zhang Z., Song Y., Chang X. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat. Methods*. 2016;13(12):1029–35.
 32. Nishida K., Arazoe T., Yachie N., Banno S., Kakimoto M., Tabata M., et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*. 2016;(353):6305.
 33. Tebas P., Stein D., Tang W.W., Frank I., Wang S.Q., Lee G., et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(10):901–910.
 34. Menger L., Sledzinska A., Bergerhoff K., Vargas F.A., Smith J., Poirot L., et al. TALEN-Mediated Inactivation of PD-1 in Tumor-Reactive Lymphocytes Promotes Intratumoral T-cell Persistence and Rejection of Established Tumors. *Cancer Res*. 2016;76(8):2087–93.
 35. Cyranoski D. Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial. *Nature*. 2016;(535):476–477.
 36. Kaiser J. First proposed human test of CRISPR passes initial safety review. *Science*. 2016.
 37. Рябых В.П., Колоскова Е.М., Езерский В.А., Трубицина Т.П., Максименко С.В. О перспективах получения трансгенных мышей-биомоделей для фармакологических и токсикологических исследований. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2015;2:5–22. [Ryabykh V.P., Koloskova E.M., Ezerskiy V.A., Trubitsina T.P., Maksimenko S.V. O perspektivakh polucheniya transgennykh myshej-biomodelej dlya farmakologicheskikh i toksikologicheskikh issledovaniy [On the prospects for obtaining transgenic

- biomodel mice for pharmacological and toxicological studies]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* [Problems of biology of productive animals]. 2015;(2):5–22. (In Russian)].
38. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2) человека. *Биомедицина*. 2016;(1):4–18. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Karkischenko N.N., Dulya M.S., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., Lazarev V.N., Maksimenko S.V., Petrova N.V., Stolyarova V.N., Trubitsina T.P. Molekulyarno-geneticheskie aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshej s integrirovannymi genami N-acetiltransferazy (NAT1 i NAT2) cheloveka [Molecular and genetic aspects of technology for producing transgenic mice with integrated N-acetyltransferase genes (NAT1 and NAT2) in humans]. *Biomedicine*. 2016;(1):4–18. (In Russian)].
39. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., Езерский В.А., Жукова О.Б., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека. *Биомедицина*. 2016;(1):52–66. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Bolotskikh L.A., Semenov Kh.Kh., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Stolyarova V.N., Trubitsina T.P. Fiziologo-embriologicheskie aspekty sozdaniya transgennykh myshej s integrirovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka [Physiological and embryological aspects of creating transgenic mice with integrated human NAT1 and NAT2 genes]. *Biomedicine*. 2016;(1):52–66. (In Russian)].
40. Каркищенко В.Н., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Матвейенко Е.Л., Петрова Н.В., Рябых В.П., Ревякин А.О., Станкова Н.В., Семенов Х.Х. Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека NAT1 и NAT2. *Биомедицина*. 2016;(1):74–85. [Karkischenko V.N., Bolotskikh L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabykh V.P., Revyakin A.O., Stan-kova N.V., Semenov Kh.Kh. Sozdanie linij transgennykh zhivotnykh-modelej s genami cheloveka NAT1 i NAT2 [Creating lines of transgenic animal models with human genes NAT1 and NAT2]. *Biomedicine*. 2016;(1):74–85. (In Russian)].
41. Рябых В.П., Трубицина Т.П., Максименко С.В., Жукова О.Б., Столярова В.Н., Езерский В.А., Колоскова Е.М. Физиолого-эмбриологические аспекты биотехнологии получения трансгенных мышей методом микроинъекции генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2016;(2):5–21. [Ryabykh V.P., Trubitsina T.P., Maksimenko S.V., Zhukova O.B., Stolyarova V.N., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M. Fiziologo-embriologicheskie aspekty biotekhnologii polucheniya transgennykh myshej metodom mikroin'ekcii genno-inzhenernykh konstruksij v pronukleusy zigot [Physiological and embryological aspects of biotechnology for producing transgenic mice by microinjection of genetically engineered structures into zygote pronuclei]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* [Problems of biology of productive animals]. 2016;(2):5–21. (In Russian)].
42. Committee on Human Gene Editing Scientific, Medical, and Ethical Considerations. *Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance*. Washington (DC): The National Academies Press, 2017.
43. Kohn D.B., Porteus M.H., Scharenberg A.M. Ethical and regulatory aspects of genome editing. *Blood*. 2016;127(21):2553–60.
44. Gantz V.M., Bier E. The dawn of active genetics. *BioEssays*. 2016;38(1):50–63.
45. Hammond A., Galizi R., Kyrou K., Simoni A., Siniscalchi C., Katsanos D., et al. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(1):78–83.
46. Gantz V.M., Jasinskiene N., Tatarenkova O., Fazeakas A., Macias V.M., Bier E., et al. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2015;112(49):6736–43.
47. Akbari O.S., Bellen H.J., Bier E., Bullock S.L., Burt A., Church G.M., et al. BIOSAFETY. Safeguarding gene drive experiments in the laboratory. *Science*. 2015;349(6251):927–929.
48. Esvelt K.M., Smidler A.L., Catteruccia F., Church G.M. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wildpopulations. *eLife*. 2014.
49. Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S.W., Wu J., Lee Y., Suzuki K., et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017;(548):413–419.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мохов Александр Анатольевич*, д.ю.н., проф.,
ФГБОУ ВО «Московский государственный юриди-
ческий университет им. О.Е. Кутафина (МГЮА)»;
e-mail: med-farm-law@mail.ru

Alexander A. Mokhov*, Dr. Sci. (Law), Prof., Ku-
tafin Moscow State Law University (MSAL);
e-mail: med-farm-law@mail.ru

Чапленко Александр Андреевич, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова»; ФГБУ «Научный центр
экспертизы средств медицинского применения»
Минздрава России;
e-mail: a.a.chaplenko@yandex.ru

Alexander A. Chaplenko, Lomonosov Moscow
State University; Scientific Centre for Expert Eval-
uation of Medicinal Products;
e-mail: a.a.chaplenko@yandex.ru

Яворский Александр Николаевич, д.м.н.,
проф., ФГБОУ ВО «Пушкинский государствен-
ный естественно-научный институт»;
e-mail: yavorskiy@genu.edu

Alexander N. Yavorskiy, Dr. Sci. (Med.), Prof.,
Pushchino State Institute of Natural Science;
e-mail: yavorskiy@genu.edu

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВЫСОКОЧАСТОТНЫХ ГАММА-ОСЦИЛЛЯЦИЙ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

И. А. Помыткин^{1,2,*}, Н. Н. Каркищенко²

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский университет)
119991, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

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

Высокочастотная электрическая активность в диапазоне 30–100 Гц, известная как гамма-ритмы, наблюдается во многих областях мозга, где она обеспечивает синхронизацию активности нейронных сетей, которые обрабатывают, передают, хранят и получают информацию. Гамма-ритмы играют ключевую роль в процессах высшей нервной деятельности, таких как внимание, сенсорное восприятие и формирование памяти, а их нарушение является общим симптомом заболеваний, связанных с нарушениями когнитивной функции, в т. ч. болезни Альцгеймера, эпилепсии и шизофрении. Исследования последних лет показали, что особая популяция ингибирующих ГАМКергических нейронов, а именно парвалбумин-положительных (PV+) интернейронов, является источником высокочастотных осцилляций. Поддержание гамма-ритмов является чрезвычайно энергозатратным процессом, который опирается на высокую скорость окислительного фосфорилирования в митохондриях нейронов и лимитируется наличием глюкозы. Инсулин, возможно, участвует в метаболическом контроле гамма-осцилляций, т. к. PV+ интернейроны селективно экспрессируют инсулин-зависимый транспортер глюкозы GLUT4, который может обеспечить дополнительный приток глюкозы в условиях функционирования, близких к предельным, как это происходит в периоды высокочастотных гамма-осцилляций. Настоящий обзор суммирует имеющиеся в научной литературе данные о связи метаболизма и высокочастотной электрической активности мозга, с упором на возможный вклад центральной инсулиновой резистентности в нарушения гамма-ритмов мозга.

Ключевые слова: гамма-осцилляции, гамма-ритм, гиппокамп, метаболизм глюкозы, инсулин, митохондрия, болезнь Альцгеймера

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Помыткин И. А., Каркищенко Н. Н. Метаболический контроль высокочастотных гамма-осцилляций в головном мозге. *Биомедицина*. 2019;15(2):43–53. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-43-53>

Поступила 27.05.2019

Принята после доработки 27.05.2019

Опубликована 10.06.2019

METABOLIC CONTROL OF HIGH-FREQUENCY GAMMA OSCILLATIONS IN THE BRAIN

Igor A. Pomytkin^{1,2,*}, Nikolay N. Karkischenko²

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya str., 8/2

² *Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Settlement Svetlye Gory, building 1*

A high-frequency electrical activity across the range of 30–100 Hz, known as gamma rhythms, is observed in many regions of the brain. This phenomenon serves to synchronize the activity of various neural networks intended to process, transmit, store and receive information. Gamma rhythms play a key role in such processes of higher nervous activity as attention, sensory perception and memory formation. Impairment of gamma rhythms is a common symptom of diseases associated with cognitive impairment, including Alzheimer's disease, epilepsy and schizophrenia. Recent studies have shown that a particular population of GABAergic-inhibiting neurons, i.e. parvalbumin-positive (PV+) interneurons, is the source of high-frequency oscillations. Maintenance of gamma rhythms is an extremely energy-intensive process that relies on a high rate of oxidative phosphorylation in the mitochondria of neurons and is limited by the presence of glucose. Insulin may be involved in the metabolic control of gamma oscillations, since PV+ interneurons selectively express the insulin-dependent glucose transporter GLUT4, which can provide an additional glucose influx under near-limit functioning conditions as in the case of high-frequency gamma oscillations. This review generalized available literature data on the relationship between metabolism and a high-frequency electrical brain activity, with an emphasis on the possible contribution of central insulin resistance to disturbances of gamma rhythms in the brain.

Keywords: gamma oscillations, gamma rhythm, hippocampus, glucose metabolism, insulin, mitochondria, Alzheimer's disease

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

For citation: Pomytkin I.A., Karkischenko N.N. Metabolic Control of High-Frequency Gamma Oscillations in the Brain. *Journal Biomed.* 2019;15(2):43–53. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-43-53>

Submitted 27.05.2019

Revised 27.05.2019

Published 10.06.2019

Введение

Высокочастотная электрическая активность мозга в диапазоне 30–100 Гц, известная как гамма-осцилляции, или гамма-ритм, наблюдается во многих областях мозга, включая гиппокамп [1, 2], неокортекс [3], энторинальную кору [4], миндалины [5], стриатум [2, 5], мозжечок [6] и таламус [7]. Высокочастотные осцилляции обеспечивают синхронизацию активности локальных нейронных сетей, которые обрабатывают, передают, хранят и получают информацию в гиппокампе и коре головного мозга. Соответственно, существует связь гамма-ритмов и процессов высшей нервной деятельности, таких как внимание [8], сенсорное восприятие [3, 6, 9] и формирование памяти [10–12]. Ключевую роль в генерации гамма-осцилляций, как полагают, играет циклическое торможение, опосредуемое рецепторами γ -аминоасляной кислоты (ГАМК-А) [13]. С учетом временных

констант ГАМК-А рецепторов, межнейронная сеть, состоящая из возбуждающих пирамидальных нейронов и быстродействующих ингибирующих ГАМКергических интернейронов, может производить ритмические флуктуации мембранного потенциала 5–10 мВ [14–17]. В этой модели быстрое возбуждение и ингибирование чередуются, поддерживая циклическое поведение в виде гамма-осцилляций, с точно синхронизированной частотой возбуждающих и ингибирующих постсинаптических токов [13]. После ввода сенсорной информации гамма-ритм возникает на временах порядка 100 мс [1, 18] и может длиться минуты [19, 20]. Поддержание высокочастотных осцилляций является чрезвычайно энергозатратным процессом, который опирается на высокую скорость окислительного фосфорилирования в митохондриях и может лимитироваться наличием субстратов, преимущественно глюкозы [21, 22].

Открытие метаболического контроля гамма-осцилляций по-новому раскрывает связь энергетического метаболизма и высокочастотной электрической активности мозга и открывает перспективу метаболической терапии заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), для которых нарушение гамма-ритма является общим симптомом. Неполный список таких заболеваний включает болезнь Альцгеймера, эпилепсию и шизофрению. Настоящий обзор суммирует имеющиеся в научной литературе данные о связи метаболизма и высокочастотной электрической активности мозга с упором на возможный вклад центральной инсулиновой резистентности в нарушения гамма-ритмов мозга.

Парвальбумин-положительные интернейроны и генерация гамма-осцилляций

Одна треть всех синапсов в ЦНС соединяется через ГАМКергические интернейроны, до 40% которых составляют парвальбумин-положительные (PV+) интернейроны [23]. Парвальбумин (PV) представляет собой кальций-связывающий белок, экспрессия которого в ЦНС ограничена преимущественно ГАМКергическими интернейронами [24, 25]. Концентрация PV в этих клетках достигает 150 мкМ [26]. PV+ интернейроны характеризуются низкой входной резистентностью и высокоамплитудной быстрой следовой гиперполяризацией, что позволяет запускать быстрые последовательности потенциалов действия, в отличие от глутаматергических пирамидальных нейронов гиппокампа, генерирующих потенциалы действия с частотой не выше 3 Гц [27, 28]. Из-за этих функциональных особенностей именно PV+ интернейроны имеют ключевое значение в генерации гамма-осцилляций при активации глутаматергических и холинергических рецепторов в гиппокампе [29–31]. Ингибирование PV+ интернейронов подавляет,

а возбуждение PV+ интернейронов, напротив, вызывает гамма-осцилляции в мозге [30]. Морфологически PV+ интернейроны подразделяют на корзинчатые (“basket cells”) и люстрообразные PV+ интернейроны (“chandelier cells”). Первые связываются с сомой и дендритами, а вторые — с начальными сегментами аксонов почти всех близлежащих пирамидальных нейронов, что обеспечивает возможность как прямого торможения возбуждающих нейронов (feedforward inhibition), так и ингибирования возбуждающих нейронов по механизму обратной связи (feedback inhibition) [23, 32, 33]. Как полагают, парвальбумин вносит вклад в контроль высокочастотной осцилляторной активности, действуя как буфер колебаний внутриклеточного кальция с особой замедленной кинетикой связывания Ca^{2+} и биэкспоненциальной кинетикой высвобождения Ca^{2+} [34].

Гипотеза энергообеспеченности PV+ интернейронов

Учитывая центральную роль PV+ интернейронов в генерации гамма-осцилляций, синхронизирующих обработку, передачу, хранение и получение информации, Канн и соавт. сформулировали гипотезу о том, что ограничение энергообеспеченности PV+ интернейронов может иметь решающее значение для снижения когнитивных способностей (“interneuron energy hypothesis”) [21]. Эта гипотеза указывает на возможность обнаружения новых терапевтических мишеней в лечении заболеваний ЦНС, для которых нарушения гамма-ритмов являются общим симптомом, включая инсульт, сосудистую деменцию, эпилепсию, шизофрению и болезнь Альцгеймера [28].

Связь гамма-осцилляций и энергетического метаболизма в нейронах

Связь между энергетическим метаболизмом и высокочастотными гамма-осцилля-

циями была показана в основном в работах Канна и соавт., которые установили в опытах *in vitro*, что генерация гамма-осцилляций в срезах гиппокампа — это чрезвычайно энергозатратный процесс, требующий производительной работы митохондрий в режимах, близких к предельным [35]. Высокочастотные осцилляции исключительно чувствительны к метаболическому стрессу, вызываемому снижением доступа к кислороду и энергетическим субстратам (глюкоза), а также к снижению функции респираторной цепи митохондрий [36, 37]. Поглощение кислорода областью CA3 гиппокампа во время гамма-осцилляций увеличивается по сравнению с периодами спонтанной активности и покоя в два и пять раз соответственно [38]. Комплекс I митохондрий, принимающий восстановительные эквиваленты от никотинамид-адениндинуклеотида (NADH) и обеспечивающий до 90% общего потребления кислорода митохондриями при нормоксии [39], участвует в поддержании гамма-осцилляций, а ингибирование или снижение экспрессии комплекса I ведет к подавлению гамма-ритма [35]. Как следствие, факторы, влияющие на производительность митохондрий, могут подавлять высокочастотные осцилляции или снижать их амплитуду в мозге.

Роль глюкозы и субстратов цикла трикарбоновых кислот в поддержании гамма-осцилляций

Глюкоза в интервале физиологических концентраций 5–10 мМ поддерживает высокоамплитудные гамма-осцилляции в образцах гиппокампа *in vitro* в течение длительного времени [22, 40]. Снижение уровня глюкозы до 2,5 мМ (гипогликемия) ведет к значительному уменьшению амплитуды осцилляций [22]. При полном отсутствии глюкозы расщепление гликогена позволяет поддерживать высокоамплитудный гамма-ритм в течение примерно 30 мин, что указывает на гликоген как на резервный

источник глюкозы для поддержания высокочастотных осцилляций в периоды гипогликемии. Следует отметить, что основным сайтом производства и хранения гликогена в мозге являются астроциты [41, 42], а нейроны в норме содержат гликоген только в малых количествах [43]. Глюкоза обеспечивает синтез аденозинтрифосфата (АТФ) как в процессе гликолиза, приводящем к образованию пирувата, так и в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях после входа полученного пирувата в цикл трикарбоновых кислот (ТСА) (рис. 1). Утилизация пирувата в реакциях ТСА ведет к восстановлению NAD^+ и образованию NADH, субстрата комплекса I, и образованию сукцината, субстрата комплекса II. Окисление этих субстратов в респираторной цепи митохондрий (ЕТС) сопряжено с получением пула АТФ, основного энергетического субстрата для поддержания гамма-осцилляций.

Роль лактата и пирувата не столь значительна, как роль глюкозы [22]. Низкие концентрации лактата и пирувата 2,5 мМ сами по себе не способны поддерживать гамма-ритм, при этом добавление 2 мМ лактата в дополнение к глюкозе сдвигает пик осцилляций на ~4 Гц в более высокочастотную область [40]. Высокие концентрации лактата и пирувата (20 мМ) способны поддерживать только низкоамплитудные гамма-осцилляции. Таким образом, лактат и пируват играют вспомогательную роль, тогда как глюкоза является главным субстратом в периоды высокочастотных осцилляций. Эти данные являются до некоторой степени неожиданными, учитывая современные представления о ведущей роли лактата, а не глюкозы, в поддержании нейрональной активности и формировании долговременной памяти [44, 42]. Кроме того, эти данные противоречат заявленной ключевой роли окислительного фосфорилирования в генерации гамма-ритма, если учитывать, что пируват как субстрат

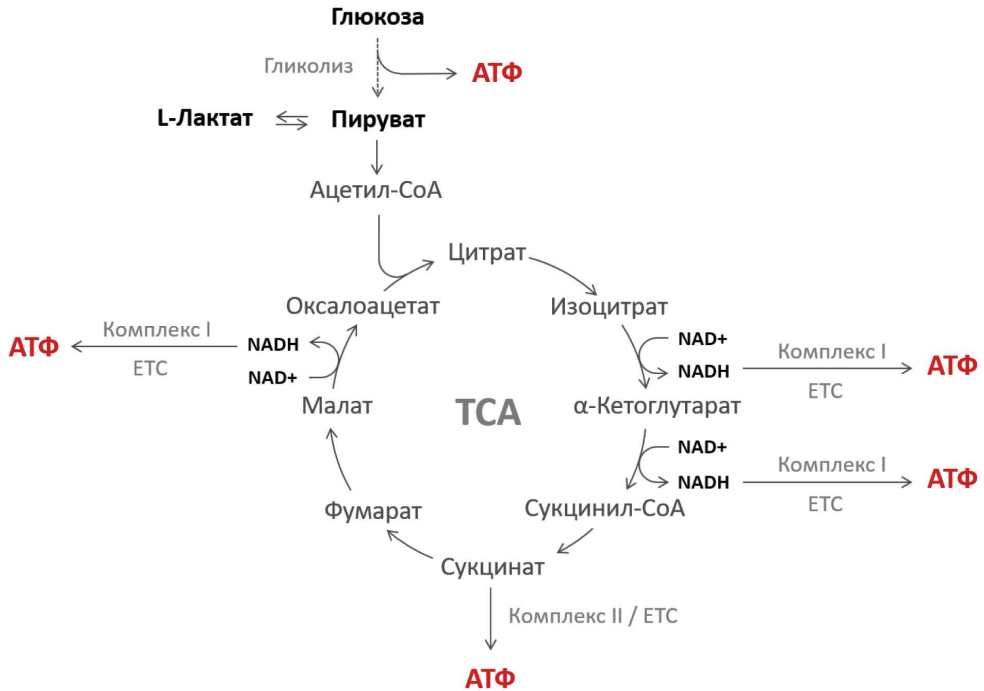


Рис. 1. Метаболизм глюкозы, приводящий к образованию АТФ, основного высокоэнергетического субстрата для поддержания гамма-осцилляций. ТСА — цикл трикарбоновых кислот; ETC — респираторная цепь митохондрий.
Fig. 1. Glucose metabolism leading to the formation of ATP, the main high-energy substrate for maintaining gamma oscillations. TCA — tricarboxylic acid cycle; ETC — mitochondrial respiratory chain.

обеспечивает наивысшие значения скорости дыхания и дыхательного контроля (>11) в митохондриях синапсов мозга [45]. Эти противоречия, возможно, снимаются при сравнении предельных скоростей транспорта субстратов. Транспорт глюкозы в нейронах GLUT3 обладает наивысшей аффинностью среди всех транспортеров глюкозы [46]. Кинетика транспорта 2-дезоксиглюкозы через GLUT3, экспрессированный в ооцитах из *Xenopus laevis*, описывается значениями $K_m = 1,4$ мМ и V_{max} примерно 500 пМ×мин⁻¹×клетка⁻¹ [47]. Кинетика транспорта лактата через нейрональный монокарбоксилат-транспортёр МСТ2, экспрессированный в ооцитах из *Xenopus laevis*, описывается значениями $K_m = 0,7$ мМ и $V_{max} = 20$ пМ×мин⁻¹×клетка⁻¹ [48]. Сравнение вышеуказанных кинетических характеристик, даже с учетом

возможного различия в экспрессии GLUT3 и МСТ2 в ооцитах, показывает, что максимальные значения скорости поглощения глюкозы могут на порядок превышать максимальные значения скорости поглощения лактата. Поэтому при потреблении субстратов в режимах, близких к предельным, более высокая скорость транспорта глюкозы может делать ее предпочтительным субстратом для поддержания гамма-осцилляций, тогда как в режимах покоя и спонтанной активности меньшие значения K_m (МСТ2) для лактата и пирувата, напротив, делают их предпочтительными субстратами для поддержания функций нейронов. Еще одно возможное объяснение состоит в том, что, наряду с GLUT3, PV+ интернейроны экспрессируют дополнительный транспортёр глюкозы GLUT4, который может обеспечить дополнительный поток

глюкозы в нейрон в условиях повышенного энергопотребления.

Роль инсулин-зависимого метаболизма глюкозы в поддержании гамма-осцилляций

GLUT4 является основным инсулин-зависимым транспортером глюкозы в периферических тканях с кинетическими характеристиками $K_m = 4,3 \text{ мМ}$ и $V_{max} = 700 \text{ пМ} \times \text{мин}^{-1} \times \text{клетка}^{-1}$, полученными при исследовании транспорта 3-О-метилглюкозы в ооцитах из *Xenopus laevis*, экспрессирующих GLUT4 [49]. GLUT4 был обнаружен в мозге, в регионах, где локализуется повышенная плотность инсулиновых рецепторов [50]. Этот транспортер экспрессируется исключительно нейронами [51]. В гиппокампе GLUT4 анатомически локализован в пирамидальном слое CA1–CA3 области [51], там, где располагаются пирамидальные нейроны и PV+ интернейроны и происходит генерация гамма-осцилляций [35]. GLUT4 экспрессируют не все нейроны, а только некоторые популяции, в т. ч. селективно PV+ интернейроны в коре, гиппокампе и мозжечке, а также холинергические нейроны базального переднего мозга [51]. Участие GLUT4 в инсулин-зависимой утилизации глюкозы мозгом было показано совсем недавно [52, 53]. Было установлено, что инсулин может стимулировать поглощение глюкозы в периоды высокой нейрональной активности, связанной с гиппокамп-зависимым обучением [53], причем инсулин-индуцированная транслокация GLUT4 в клеточную плазматическую мембрану является механизмом, посредством которого нейроны гиппокампа могут быстро увеличить потребление глюкозы [52, 53]. Хотя в литературе отсутствуют прямые доказательства функциональной роли инсулина и GLUT4 в повышенном потреблении глюкозы PV+ интернейронами, наличие GLUT4 в PV+ интернейронах, локализованных в пирамидальном слое CA3 области, указывает на возможность допол-

нительного потребления глюкозы именно этими клетками в условиях повышенного расхода энергии при генерации гамма-осцилляций. Интересно, что инсулин-зависимый транспортер глюкозы GLUT4 также экспрессируется холинергическими нейронами базального переднего мозга. Ацетилхолин является одним из известных индукторов гамма-осцилляций [35]. Базальный передний мозг является основным местом производства ацетилхолина, который затем распределяется по аксональным проекциям в разные области коры головного мозга, где может вносить вклад в генерацию гамма-осцилляций через активацию M1-мускариновых рецепторов [54]. В целом эти данные указывают на возможную роль инсулина как селективного активатора метаболизма глюкозы в группах нейронов, которые участвуют в генерации высокочастотных осцилляций.

В литературе имеются весьма ограниченные данные о влиянии инсулина на гамма-осцилляции в мозге. Все они получены в опытах *in vitro*. Инсулин вызывал генерацию осцилляций на частоте 64 Гц (гамма-ритм) в дозозависимой манере, хотя ингибировал спонтанные осцилляции на частоте 20 Гц в срезах гиппокампа [55]. Инсулин предотвращал вызванную бета-амилоидом деградацию гамма-осцилляций в пирамидальных нейронах и PV+ интернейронах [56]. Эти данные, несмотря на ограниченность, тем не менее, указывают на возможное участие инсулина в поддержании высокочастотной электрической активности мозга, а также на возможную роль инсулиновой резистентности в нарушениях высокочастотных гамма-осцилляций при болезни Альцгеймера.

Нарушение гамма-ритма мозга при болезни Альцгеймера

Следует отметить, что практически все данные о связи метаболизма и гамма-осцилляций получены в опытах *in vitro*,

в основном, на срезах гиппокампа, и нуждаются в подтверждении в исследованиях *in vivo*. Классическим состоянием, при котором нарушен церебральный метаболизм глюкозы, является болезнь Альцгеймера (БА). Накопление олигомеров бета-амилоида, как полагают, является основной характерной патогенетической особенностью этой болезни. При этом БА характеризуется значительным снижением утилизации глюкозы за счет массивной потери транспортеров глюкозы GLUT1 и GLUT3 в гиппокампе и коре головного мозга [57], а также из-за нарушений в транслокации инсулин-зависимого транспортера GLUT4, вызванных токсическими эффектами олигомеров бета-амилоида [58, 59]. БА сопровождается выраженной центральной инсулиновой резистентностью. Было показано, что активация инсулинового рецептора и его субстрата (IRS-1) в мозге пациентов с БА в ответ на одну и ту же концентрацию инсулина меньше на 29–34 и 90% соответственно по сравнению с контролем [60]. Вместе эти данные свидетельствуют о нарушении как инсулин-независимого, так и инсулин-зависимого метаболизма глюкозы в мозге у больных БА.

Снижение амплитуды гамма-осцилляций наблюдалось у трансгенных животных, продуцирующих человеческий белок — предшественник амилоида (hAPP) [61]. Нарушения гамма-ритмов у пациентов с БА имеют более сложный характер, что, как полагают, связано с большей сложностью мозга человека [62]. «Гамма-ответом» называют гамма-осцилляции, вызываемые внешними сенсорными или когнитивными стимулами [63, 64]. Было установлено, что у пациентов с БА когнитивный гамма-ответ происходит с задержкой (более чем на 100 мс) по сравнению с здоровыми волонтерами, что отражает задержку передачи нейронных сигналов в когнитивных нейронных сетях. Кроме того, пациенты с БА имели сниженный сенсорный гамма-ответ на визуальный сти-

мул [65]. Эти данные поддерживают идею о возможности метаболического контроля гамма-осцилляций в мозге, если учесть, что пациенты с БА имеют выраженный гипометаболизм глюкозы в мозге.

Метаболический контроль гамма-осцилляций

Схема, показанная на рис. 2, суммирует имеющиеся в литературе данные о роли церебрального метаболизма глюкозы в поддержании высокочастотных гамма-осцилляций, с учетом их неполноты и того обстоятельства, что эти данные были получены преимущественно в опытах *in vitro*. Область СА3, как было показано, является основным источником гамма-осцилляций в гиппокампе. Нейронные сигналы от энторинальной коры (EC) и, далее, гранулярных клеток зубчатой извилины (GNC) гиппокампа приходят в СА3 область, где генерируют потенциалы действия в возбуждающих пирамидальных нейронах (PN) и PV+ интернейронах (PV+). Индукция ингибиторных потенциалов действия PV+ интернейронами в пирамидальных нейронах по механизмам прямой (feedforward, FF) или обратной связи (feedback, FB) вызывает генерацию высокочастотных гамма-осцилляций в диапазоне 30–100 Гц. Последующее поступление нейронных сигналов в область СА1 гиппокампа и, далее, в кору головного мозга (CRTX) обеспечивает синхронную активацию локальных нейронных сетей, необходимую для процессов получения, обработки и хранения информации. Генерация высокочастотных осцилляций PV+ интернейронами является чрезвычайно энергозатратным процессом и зависит от наличия глюкозы. Снижение уровня глюкозы (гипогликемия) или нарушение процессов утилизации глюкозы (потеря транспортеров глюкозы GLUT3 и GLUT4) отрицательно влияют на гамма-ритмы мозга. Селективная экспрессия PV+ интернейронами инсулин-зависимых транспортеров глюкозы GLUT4 указывает

на возможную функциональную роль инсулина в регуляции высокочастотных осцилляций в мозге, а также на возможный вклад селективной инсулиновой резистентности PV+ интернейронов в прогресс заболеваний ЦНС, сопровождающихся когнитивными нарушениями.

Перспективы

Исследование высокочастотных осцилляций в мозге имеет важное значение, т. к. их нарушение сопровождается ряд заболеваний ЦНС, неполный список которых включает БА, сосудистую деменцию, эпилепсию, шизофрению и депрессию. Открытая недавно связь между гамма-осцилляциями и метаболизмом глюкозы в мозге (метаболический контроль), а также выявленная ключевая роль PV+ интернейронов в этих взаимоотно-

шениях открывают возможность разработки новых подходов к лечению этих заболеваний. Следует отметить, что имеющиеся в литературе данные получены в основном в опытах *in vitro* и требуют подтверждения в исследованиях *in vivo*. Возможная роль инсулина в поддержании гамма-осцилляций выглядит особенно интригующей, но требует прямых подтверждений в опытах *in vivo*. В целом имеющиеся в литературе данные указывают на то, что нарушение высшей нервной деятельности, опосредуемое высокочастотными осцилляциями ансамблей нейронов и нейронных сетей, является отчасти специфическим метаболическим расстройством, одним из подходов к лечению которого может быть восстановление чувствительности к инсулину в парвальбумин-положительных ГАМКергических интернейронах.

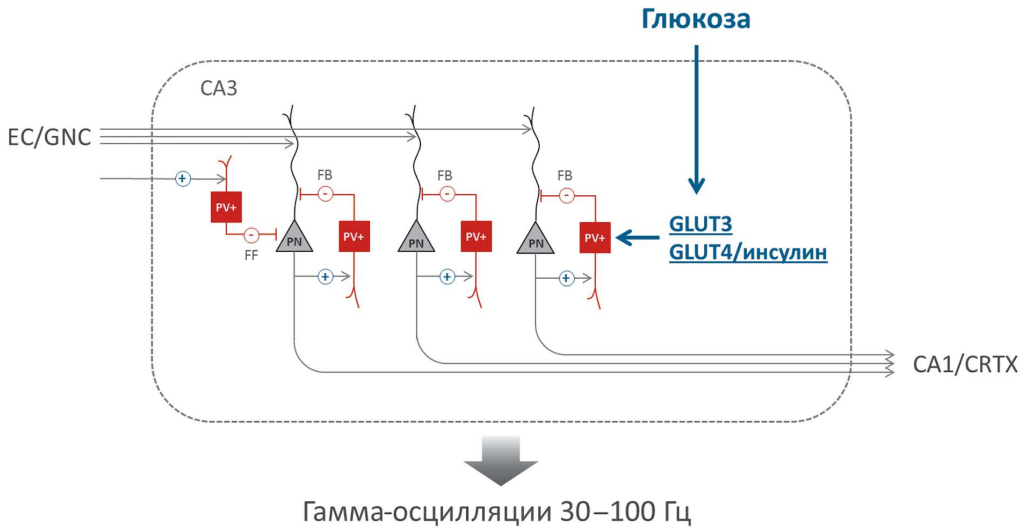


Рис. 2. Метаболический контроль гамма-осцилляций в CA3 области гиппокампа. EC/GNC — энторинальная кора и гранулярные клетки зубчатой извилины; CA1/CRTX — область гиппокампа CA1 и кора головного мозга; PV+ — парвальбумин-положительные ингибиторные ГАМКергические интернейроны; PN — возбуждающие пирамидальные нейроны; FF — прямая отрицательная связь (feedforward); FB — обратная отрицательная связь (feedback); GLUT3 — основной нейрональный транспортер глюкозы; GLUT4 — инсулин-зависимый транспортер глюкозы.

Fig. 2. Metabolic control of gamma oscillations in the CA3 region of the hippocampus. EC/GNC — entorhinal cortex and granular neuron cells of the dentate gyrus; CA1/CRTX — CA1 hippocampal region and cerebral cortex; PV+ — parvalbumin-positive inhibitory GABAergic interneurons; PN — excitatory pyramidal neurons; FF — direct negative relationship (feedforward); FB — negative feedback (feedback); GLUT3 — the main neuronal glucose transporter; GLUT4 — an insulin-dependent glucose transporter.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Bragin A., Jandó G., Nádasdy Z., Hetke J., Wise K., Buzsáki G. Gamma (40–100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J. Neurosci.* 1995;15(1 Pt 1):47–60.
- Tort A.B., Kramer M.A., Thorn C., Gibson D.J., Kubota Y., Graybiel A.M., et al. Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008;105(51):20517–22. DOI: 10.1073/pnas.0810524105.
- Gray C.M., Singer W. Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1989;86(5):1698–1702.
- Chrobak J.J., Buzsáki G. Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J. Neurosci.* 1998;18(1):388–398.
- Popescu A.T., Popa D., Paré D. Coherent gamma oscillations couple the amygdala and striatum during learning. *Nat. Neurosci.* 2009;12(6):801–807. DOI: 10.1038/nn.2305.
- Popa D., Spolidoro M., Proville R.D., Guyon N., Bellevue L., Léna C. Functional role of the cerebellum in gamma-band synchronization of the sensory and motor cortices. *J. Neurosci.* 2013;33(15):6552–56. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5521-12.2013.
- Pinault D., Deschênes M. Voltage-dependent 40-Hz oscillations in rat reticular thalamic neurons in vivo. *Neuroscience.* 1992;51(2):245–258.
- Fries P., Reynolds J.H., Rorie A.E., Desimone R. Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science.* 2001;4:1259–64.
- Zhang Z.G., Hu L., Hung Y.S., Mouraux A., Iannetti G.D. Gamma-band oscillations in the primary somatosensory cortex — a direct and obligatory correlate of subjective pain intensity. *J. Neurosci.* 2012;32(22):7429–38. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5877-11.2012.
- Lisman J.E., Idiart M.A. Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles. *Science.* 1995;267(5203):1512–15.
- de Almeida L., Idiart M., Lisman J.E. Memory retrieval time and memory capacity of the CA3 network: role of gamma frequency oscillations. *Learn Mem.* 2007;14(11):795–806.
- Jensen O., Kaiser J., Lachaux J.P. Human gamma-frequency oscillations associated with attention and memory. *Trends Neurosci.* 2007;30(7):317–324.
- Buzsáki G., Wang X.J. Mechanisms of gamma oscillations. *Annu. Rev. Neurosci.* 2012;35:203–225.
- Wilson H.R., Cowan J.D. Excitatory and inhibitory interactions in localized populations of model neurons. *Biophys. J.* 1972;12(1):1–24.
- Leung L.S. Nonlinear feedback model of neuronal populations in hippocampal CA1 region. *J. Neurophysiol.* 1982;47(5):845–868.
- Whittington M.A., Traub R.D., Jefferys J.G. Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature.* 1995;373(6515):612–615.
- Salkoff D.B., Zagha E., Yüzgeç Ö., McCormick D.A. Synaptic Mechanisms of Tight Spike Synchrony at Gamma Frequency in Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* 2015;35(28):10236–51.
- Pantev C., Makeig S., Hoke M., Galambos R., Hampson S., Gallen C. Human auditory evoked gamma-band magnetic fields. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1991;88(20):8996–9000.
- Lehmann D., Faber P.L., Achermann P., Jeanmonod D., Gianotti L.R., Pizzagalli D. Brain sources of EEG gamma frequency during volitionally meditation-induced, altered states of consciousness, and experience of the self. *Psychiatry Res.* 2001;108(2):111–121.
- Lutz A., Greischar L.L., Rawlings N.B., Ricard M., Davidson R.J. Long-term meditators self-induce high-amplitude gamma synchrony during mental practice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004;101(46):16369–73.
- Kann O., Papageorgiou I.E., Draguhn A. Highly energized inhibitory interneurons are a central element for information processing in cortical networks. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2014;34(8):1270–82. DOI: 10.1038/jcbfm.2014.104.
- Galow L.V., Schneider J., Lewen A., Ta T.T., Papageorgiou I.E., Kann O. Energy substrates that fuel fast neuronal network oscillations. *Front Neurosci.* 2014;8:398. DOI: 10.3389/fnins.2014.00398.
- Tremblay R., Lee S., Rudy B. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron.* 2016;91(2):260–292. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.06.033.
- Celio M.R., Heizmann C.W. Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature.* 1981;293(5830):300–302.
- Celio M.R. Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science.* 1986;231(4741):995–997.
- Collin T., Chat M., Lucas M.G., Moreno H., Racay P., Schwaller B., et al. Developmental changes in parvalbumin regulate presynaptic Ca²⁺ signaling. *J. Neurosci.* 2005;25(1):96–107.
- Kawaguchi Y., Kubota Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex.* 1997;7(6):476–486.
- Kann O. The interneuron energy hypothesis: Implications for brain disease. *Neurobiol. Dis.* 2016;90:75–85. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.08.005.
- Bartos M., Vida I., Jonas P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007;8(1):45–56.
- Sohal V.S., Zhang F., Yizhar O., Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical

- circuit performance. *Nature*. 2009;459(7247):698–702. DOI: 10.1038/nature07991.
31. Gulyás A.I., Szabó G.G., Ulbert I., Holderith N., Monyer H., Erdélyi F., et al. Parvalbumin-containing fast-spiking basket cells generate the field potential oscillations induced by cholinergic receptor activation in the hippocampus. *J. Neurosci.* 2010;30(45):15134–45. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4104-10.2010.
 32. Packer A.M., Yuste R. Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition? *J. Neurosci.* 2011;31(37):13260–71. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3131-11.2011.
 33. Hu H., Gan J., Jonas P. Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science*. 2014;345(6196):1255263. DOI: 10.1126/science.1255263.
 34. Schwaller B. Cytosolic Ca²⁺ buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(11):a004051. DOI: 10.1101/cshperspect.a004051.
 35. Kann O., Huchzermeyer C., Kovács R., Wirtz S., Schuelke M. Gamma oscillations in the hippocampus require high complex I gene expression and strong functional performance of mitochondria. *Brain*. 2011;134(Pt 2):345–358. DOI: 10.1093/brain/awq333.
 36. Huchzermeyer C., Albus K., Gabriel H.J., Otáhal J., Taubenberger N., Heinemann U., et al. Gamma oscillations and spontaneous network activity in the hippocampus are highly sensitive to decreases in pO₂ and concomitant changes in mitochondrial redox state. *J. Neurosci.* 2008;28(5):1153–62. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4105-07.2008.
 37. Kann O., Hollnagel J.O., Elzohairy S., Schneider J. Energy and Potassium Ion Homeostasis during Gamma Oscillations. *Front. Mol. Neurosci.* 2016;9:47. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00047.
 38. Huchzermeyer C., Berndt N., Holzhütter H.G., Kann O. Oxygen consumption rates during three different neuronal activity states in the hippocampal CA3 network. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2013;33(2):263–271. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.165.
 39. Lukyanova L.D., Kirova Y.I. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Front. Neurosci.* 2015;9:320. DOI: 10.3389/fnins.2015.00320.
 40. Schneider J., Lewen A., Ta T.T., Galow L.V., Isola R., Papageorgiou I.E., et al. A reliable model for gamma oscillations in hippocampal tissue. *J. Neurosci. Res.* 2015;93(7):1067–78. DOI: 10.1002/jnr.23590.
 41. Cataldo A.M., Broadwell R.D. Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J. Neurocytol.* 1986;15(4):511–524.
 42. Cali C., Tauffenberger A., Magistretti P. The Strategic Location of Glycogen and Lactate: From Body Energy Reserve to Brain Plasticity. *Front. Cell Neurosci.* 2019;13:82. DOI: 10.3389/fncel.2019.00082.
 43. Saez I., Duran J., Sinadinos C., Beltran A., Yanes O., Tevy M.F., et al. Neurons have an active glycogen metabolism that contributes to tolerance to hypoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2014;34(6):945–955. DOI: 10.1038/jcbfm.2014.33.
 44. Suzuki A., Stern S.A., Bozdagi O., Huntley G.W., Walker R.H., Magistretti P.J., et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*. 2011;144(5):810–823. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.018.
 45. Lai J.C., Walsh J.M., Dennis S.C., Clark J.B. Synaptic and non-synaptic mitochondria from rat brain: isolation and characterization. *J. Neurochem.* 1977;28(3):625–631.
 46. Simpson I.A., Dwyer D., Malide D., Moley K.H., Travis A., Vannucci S.J. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008;295(2):E242–E253. DOI: 10.1152/ajpendo.90388.2008.
 47. Colville C.A., Seatter M.J., Jess T.J., Gould G.W., Thomas H.M. Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochem. J.* 1993;290(Pt 3):701–706.
 48. Bröer S., Bröer A., Schneider H.P., Stegen C., Halstrap A.P., Deitmer J.W. Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* 1999;341(Pt 3):529–535.
 49. Nishimura H., Pallardo F.V., Seidner G.A., Vannucci S., Simpson I.A., Birnbaum M.J. Kinetics of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 1993;268(12):8514–20.
 50. El Messari S., Leloup C., Quignon M., Brisorgueil M.J., Penicaud L., Arluison M. Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 1998;399(4):492–512.
 51. Apelt J., Mehlhorn G., Schliebs R. Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *J. Neurosci. Res.* 1999;57(5):693–705.
 52. Grillo C.A., Piroli G.G., Hendry R.M., Reagan L.P. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res.* 2009;1296:35–45. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.08.005.
 53. Pearson-Leary J., Jahagirdar V., Sage J., McNay E.C. Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4. *Behav. Brain Res.* 2018;338:32–39. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.09.033.
 54. Tikhonova T.B., Miyamae T., Gulchina Y., Lewis D.A., Gonzalez-Burgos G. Cell Type- and Layer-Specific Muscarinic Potentiation of Excitatory Synaptic Drive onto Parvalbumin Neurons in Mouse Prefrontal Cortex. *eNeuro.* 2018;5(5). pii: ENEURO.0208-18.2018. DOI: 10.1523/ENEURO.0208-18.2018.

55. Palovcik R.A., Phillips M.I., Kappy M.S., Raizada M.K. Insulin inhibits pyramidal neurons in hippocampal slices. *Brain Res.* 1984;309(1):187–191.
56. Kurudenkandy F.R., Zilberter M., Biverstäl H., Presto J., Honcharenko D., Strömberg R., et al. Amyloid- β -induced action potential desynchronization and degradation of hippocampal gamma oscillations is prevented by interference with peptide conformation change and aggregation. *J. Neurosci.* 2014;34(34):11416–25. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1195-14.2014.
57. Simpson I.A., Chundu K.R., Davies-Hill T., Honer W.G., Davies P. Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1994;35(5):546–551.
58. Pearson-Leary J., McNay E.C. Intrahippocampal administration of amyloid- β (1–42) oligomers acutely impairs spatial working memory, insulin signaling, and hippocampal metabolism. *J. Alzheimers Dis.* 2012;30(2):413–422. DOI: 10.3233/JAD-2012-112192.
59. Oliveira L.T., Leon G.V.O., Provance D.W. Jr, de Mello F.G., Sorenson M.M., Salerno V.P. Exogenous β -amyloid peptide interferes with GLUT4 localization in neurons. *Brain Res.* 2015;1615:42–50. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.04.026.
60. Talbot K., Wang H.Y., Kazi H., Han L.Y., Bakshi K.P., Stucky A., et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 2012;122(4):1316–38. DOI: 10.1172/JCI59903.
61. Verret L., Mann E.O., Hang G.B., Barth A.M., Cobos I., Ho K., et al. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell.* 2012;149(3):708–721. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.046.
62. Başar E., Femir B., Emek-Savaş D.D., Güntekin B., Yener G.G. Increased long distance event-related gamma band connectivity in Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin.* 2017;14:580–590. DOI: 10.1016/j.nicl.2017.02.021.
63. Başar E., Ozesmi C. The hippocampal EEG-activity and a systems analytical interpretation of averaged evoked potentials of the brain. *Kybernetik.* 1972;12(1):45–54.
64. Başar E. A review of gamma oscillations in healthy subjects and in cognitive impairment. *Int. J. Psychophysiol.* 2013;90(2):99–117. DOI: 10.1016/j.ijpsycho.2013.07.005.
65. Başar E., Emek-Savaş D.D., Güntekin B., Yener G.G. Delay of cognitive gamma responses in Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin.* 2016;11:106–115. DOI: 10.1016/j.nicl.2016.01.015.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Помыткин Игорь Анатольевич*, к.х.н., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет); ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

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

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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ЛАБОРАТОРНЫХ ИНБРЕДНЫХ И ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ В ОЦЕНКЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА И ПОИСКЕ НОВЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ

М.С. Дуля*, В.Н. Каркищенко, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов, Н.Н. Каркищенко

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1

В статье приведены результаты исследований цитокинового профиля лабораторных мышей, включая впервые установленные данные цитокинового статуса трансгенных мышей NAT1hom и NAT2hom. Использована методология анализа цитокинов в сыворотке крови лабораторных животных методом мультиплексного xMAP-анализа на магнитных частицах. Для мышей инбредных линий C57BL/6 и Balb/c представлены данные по изменению количественного содержания цитокинов в плазме крови мышей после однократного введения препаратов полимурамил и такролимус. Изучено влияние на цитокиновый профиль иммуносупрессора — такролимуса и иммуномодулятора — полимурамила. Особое внимание уделено динамике концентрации фактора некроза опухоли (TNF- α) как одному из важнейших критериев биологического действия иммуномодуляторов. Определена продукция TNF- α в условиях экспериментальной иммуносупрессии, подтверждены иммуномодулирующие свойства полимурамила в условиях острого воспаления на модели гриппа у мышей. Предложено использовать трансгенных гуманизированных мышей линий NAT1hom и NAT2hom в иммунологических исследованиях и поиске новых фармакологических молекул-регуляторов, метаболизирующихся с участием систем ацетилирования организма. Полученные данные сопоставлены с влиянием на цитокиновый статус ингината — эффективного ингибитора N-ацетилтрансферазы (NAT2), имеющего выраженное иммуномодулирующее действие при продукции ИФН-гамма и ФНО-альфа.

Ключевые слова: цитокиновый профиль, ингинат, магнитные частицы, NAT1hom, NAT2hom — трансгенные гуманизированные линии мышей, иммунологический статус, иммуносупрессия, такролимус, иммуномодуляторы, полимурамил

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Дуля М.С., Каркищенко В.Н., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Каркищенко Н.Н. Цитокиновый профиль лабораторных инбредных и трансгенных мышей в оценке иммунологического статуса и поиске новых фармакологических регуляторов. *Биомедицина*. 2019;15(2):54–62. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-54-62>

Поступила 27.05.2019

Принята после доработки 27.05.2019

Опубликована 10.06.2019

CYTOKINE PROFILE OF LABORATORY INBRED AND TRANSGENIC MICE IN THE EVALUATION OF THE IMMUNOLOGICAL STATUS AND SEARCH FOR NEW PHARMACOLOGICAL REGULATORS

Maxim S. Dulya*, Vladislav N. Karkischenko, Daniil V. Khvostov, Ruslan A. Ageldinov, Nikolay N. Karkischenko

*Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Settlement Svetlye Gory, building 1*

This article presents the results of studies aimed at investigating the cytokine profile of laboratory mice, including novel data on the cytokine status of transgenic mice NAT1^{hom} and NAT2^{hom}. The investigation of cytokines in the blood serum of laboratory animals was carried out using multiplex xMAP-analysis on magnetic particles. For mice of inbred lines C57BL/6 and Balb/c, data is presented with respect to changes in the quantitative content of cytokines in the blood plasma after a single injection of the Polymuramyl and Tacrolimus drugs. Effects of the Tacrolimus immunosuppressant and the Polymuramyl immunomodulator on the mouse cytokine profile were estimated.

A particular attention was paid to the dynamics of the concentration of the tumour necrosis factor (TNF- α) as one of the most important criteria of the biological action of immunomodulators. The production of TNF- α in experimental immunosuppression was determined. The immunomodulating properties of Polymuramyl were confirmed under the conditions of acute inflammation by simulating influenza in mice. It is established that transgenic humanized mice of NAT1^{hom} and NAT2^{hom} lines can be successfully used in immunological studies and search for new pharmacological regulatory molecules metabolized with the participation of body acetylation systems. The obtained data are compared with the effect of ingenat — an effective inhibitor of N-acetyltransferase (NAT2) — on the cytokine status. This drug is characterized by a pronounced immunomodulating effect on the production of IFN-gamma and TNF-alpha.

Keywords: cytokine profile, ingenat, magnetic particles, NAT1^{hom}, NAT2^{hom}, transgenic humanized mice, immunological status, immunosuppressive therapy, tacrolimus, immunomodulators, polymuramyl.

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

For citation: Dulya M.S., Karkischenko V.N., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Karkischenko N.N. Cytokine Profile of Laboratory Inbred and Transgenic Mice in the Evaluation of the Immunological Status and Search for New Pharmacological Regulators. *Journal Biomed.* 2019;15(2):54–62. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-54-62>

Submitted 27.05.2019

Revised 27.05.2019

Published 10.06.2019

Введение

Цитокины представляют собой продуцируемые клетками белково-пептидные факторы, осуществляющие короткодистантную регуляцию межклеточных и межсистемных взаимодействий. Цитокины определяют выживаемость клеток, стимуляцию или ингибирование их роста, дифференцировку, функциональную активацию и апоптоз клеток. Способность регулировать перечисленные функции обусловлена тем, что после взаимодействия цитокинов с комплементарными рецепторами на поверхности клеток [6] сигнал через элементы внутриклеточной трансдукции передается в ядро, где активируются соответствующие гены [7, 8]. Белки, продукты активированных цитокинами генов, продуцируются клетками и регулируют перечисленные выше процессы.

Действие цитокинов тесно связано с физиологическими и патофизиологическими реакциями организма. При этом происходит модуляция как локальных, так и системных механизмов защиты. Одной из важнейших функций системы цитокинов является обеспечение согласованного действия иммунной, эндокринной и нервной системы в ответ на стресс. Усиление продукции определенных цитокинов воспаления или факторов, стимулирующих рост лимфоцитов, может лежать в основе некоторых заболеваний. В то же время снижение уровня ряда цитокинов также способно провоцировать заболевание. Так, колониестимулирующий фактор (CSF) играет ведущую роль в нормальном гемопоэзе, и уменьшение его продукции нарушает механизмы защиты против инфекций.

Особенно большую роль цитокины играют в формировании патогенеза опухолевых заболеваний иммунной системы. Эти заболевания развиваются из клеток основных продуцентов и/или потребителей цитокинов. Гены цитокинов сопряженно активируются с онкогенами при хромосомных aberrациях и при ретровирусных инфекциях. Вследствие этого опухолевые клетки продуцируют цитокины, стимулирующие пролиферацию неопластических иммунокомпетентных клеток.

Поскольку цитокины являются локальными медиаторами, более целесообразно измерять их уровни в соответствующих тканях после экстракции тканевых протеинов или в естественных жидкостях — например, в слезе, смывах из полостей, моче, спинномозговой жидкости и т.д. Уровни цитокинов в сыворотке или др. биологических жидкостях отражают текущее состояние работы иммунной системы, т.е. синтез цитокинов клетками организма *in vivo*. Определение уровней продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови (МПК) *in vitro* показывает функциональное состояние клеток. Спонтанная продукция цитокинов МПК в культуре свидетельствует, что клетки уже инактивированы *in vivo*. Индуцированный (различными стимуляторами, митогенами) синтез цитокинов отражает потенциальную, резервную способность клеток отвечать на антигенный стимул (в частности, на действие лекарственных препаратов). Сниженная индуцированная продукция цитокинов *in vitro* может служить одним из признаков иммунодефицитного состояния.

Ранее нами получены экспериментальные данные о биологическом действии препаратов — производных флуорена: тилорона и ингината. Препараты выступают как эффективные ингибиторы N-ацетилтрансферазы (NAT) и оказывают иммуномодулирующее действие при продукции цитокинов ИФН-гамма и ФНО-альфа [1].

Данные наблюдения применимы для поиска производных флуорена как перспективных средств в моделировании противовирусных молекул-кандидатов и иммуностимуляторов. На основе полученных данных *in vitro* эксперимента по ферментативной активности установлено эффективное ингибирующее действие производных флуорена (тилорона и ингината) по ферменту NAT2 человека.

При оценке уровней цитокинов необходимо помнить, что они являются антигеннеспецифическими факторами. Поэтому специфическая диагностика инфекционных, аутоиммунных и аллергических заболеваний с помощью определения уровня тех или иных цитокинов невозможна. Тем не менее, изучение уровней цитокинов позволяет получить информацию о функциональной активности различных типов иммунокомпетентных клеток [8, 9]; о тяжести воспалительного процесса, его переходе на системный уровень и прогнозе; о соотношении процессов активации Т-хелперов 1 и 2 типов, что очень важно при дифференциальной диагностике ряда инфекционных и иммунопатологических процессов; о стадии развития ряда аллергических и аутоиммунных заболеваний. Кроме того, определение уровней цитокинов используется при применении новых иммуномодулирующих препаратов на основе рекомбинантных цитокинов и их антагонистов для изучения фармакокинетики этих препаратов, а также их способности индуцировать синтез других цитокинов.

Особый интерес представляет иммунологический статус трансгенных гуманизированных мышей, используемых в качестве биомоделей патогенезов и применяемых в направленном поиске новых фармакологических регуляторов.

Основным путем метаболизма широкого ряда лекарственных средств и ксенобиотиков, включая канцерогены, является N-ацетилирование, которое происходит

при участии ферментов N-ацетилтрансфераз (NAT1 и NAT2). Ранее нами получены генетические конструкции с генами человека NAT1 и NAT2 и успешно выведены поколения устойчивых трансгенных линий мышей (NAT1_{hom}, NAT2_{hom}), несущих эти гены [1–3]. Методами молекулярно-генетического (ПЦР, Вестерн-блоттинг) и биоаналитического анализа (ВЭЖХ-МС, спектрофотометрия) установлено наличие трансгенов и определены экспрессия, активность белков NAT1 и NAT2 человека в тканях гуманизированных мышей [4]. Разработаны новые методы оценки эффективности и безопасности применения перспективных фармакологических средств с использованием трансгенных экспериментальных животных, несущих гены NAT1 и NAT2 человека, а также подходы по скринингу молекул-кандидатов на основе соединений — ингибиторов ферментов N-ацетилтрансфераз человека [5].

Цитокиновый профиль трансгенных гуманизированных мышей ранее в литературе не описан и представляет фундаментальный и прикладной интерес.

Цель работы — исследовать цитокиновый профиль линий лабораторных мышей C57BL/6, Balb/c и трансгенных гуманизированных NAT1_{hom}, NAT2_{hom} методом xMAP-мультиплексного анализа на магнитных частицах. На примере выбранных лекарственных средств (иммуносупрессора — такролимуса и иммуномодулятора — полимурамила) оценить паттерн изменений цитокинового профиля для линий мышей C57BL/6 и Balb/c, фармакодинамику и характер иммунологического действия выбранных модельных препаратов.

Материалы и методы

Цитокиновый профиль плазмы крови всех испытуемых животных определяли с помощью мультиплексного анализа на системе «Bio-Plex Magpix» (Bio-Rad, США).

Данный метод представляет собой мультиплексную иммунную реакцию, протекающую на магнитных микрочастицах, с их последующим проточным флуоресцентным анализом и одновременным определением содержания цитокинов. Пользовались стандартной коммерчески доступной панелью на 23 цитокина (Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay, #M60009RDPD). Плазму крови, стабилизированную ЭДТА, вносили в лунки планшета. Дальнейшие операции выполняли в соответствии с протоколом производителя.

Иммунологическое действие лекарственных средств — такролимуса и полимурамила — на цитокиновый профиль определяли на мышах-самцах линии Balb/c и C57Bl/6 массой 20±2 г. Первоначально вводили 0,3 мл водно-спиртового р-ра иммуносупрессора — такролимуса в дозе 0,5 мг/мышь. Дальнейшее введение полимурамила выполняли спустя 30–40 мин в дозе 10 и 50 мкг/мышь внутримышечно. Группе контрольных животных вводили физ. р-р и р-р полимурамила (10 мкг/мышь) без предварительного введения такролимуса. Образцы плазмы крови для определения уровня цитокинов отбирали через 1,5 ч от начала эксперимента.

Для определения иммуномодулирующей активности полимурамила по его влиянию на продукцию ФНО-альфа (TNF-α) и др. цитокинов использована модель гриппа на мышах линии Balb/c массой 16–18 г (мышьяная модель острого воспаления). Применялся штамм вируса гриппа H5N2, адаптированный к мышам и вызывающий при интраназальном заражении летальную двухстороннюю пневмонию. Полимурамил вводился ежедневно внутримышечно в объеме 0,5 мл. Длительность введения — 5 дней, начиная со второго дня после заражения (через 16–18 ч после заражения). На подготовительном этапе проводили определение дозы вируса гриппа H5N2 для интраназального заражения: была

подобрана доза, вызывающая гибель 80% мышей в контрольной группе (без введения препарата). Действие полимурамила изучали в трех дозах: 50, 10 и 2 мкг/мышь (≈ 900 , 180 и 36 мкг/кг). Забор плазмы крови проводили у выживших животных на 5-е сут после начала эксперимента в аналогичных первой части исследования условиях.

Результаты исследований

Получен массив первичных данных, позволяющий оценить цитокиновый статус трансгенных гуманизированных мышей NAT1hom, NAT2hom, а также характер и динамику иммунобиологического воздействия лекарственных средств — на примере препаратов иммуносупрессивного действия (такролимус) и иммуномодулирующего (полимурамил) действия — по изменению содержания 23 цитокинов и хемокинов во времени.

Сопоставление полученного нами цитокинового профиля плазмы крови трансгенных мышей NAT1hom, NAT2hom с открытыми базами данных цитокинового статуса (рис. 1) инбредных линий мышей и человека (CytReg и др.) отражает иммунологическую близость генетически-модифицированных линий к цитокиновому профилю человека.

Анализ динамических изменений профиля цитокинов для инбредных линий C57Bl/6 и Balb/c показывает, что при введении животным полимурамила формируется отчетливый цитокиновый ответ. При этом наиболее выраженная реакция касается таких цитокинов и хемокинов, как IL-1b, IL-5, MCP-1, IL-6, TNF- α , G-CSF, RANTES, MIP-1b и IFN- γ .

Типичная динамика содержания TNF- α в плазме крови испытуемых животных представлена на рис. 2.

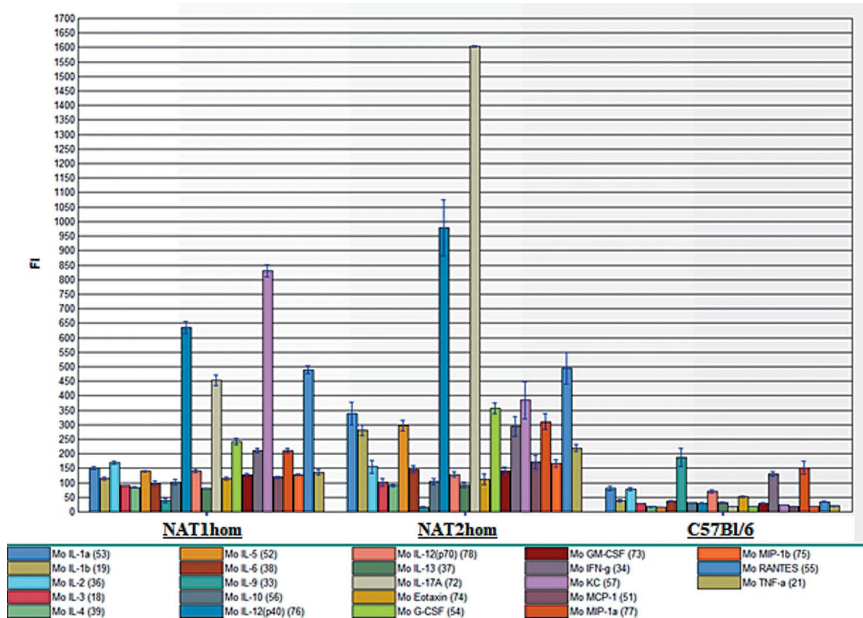


Рис. 1. Сравнительная гистограмма цитокинового профиля плазмы лабораторных трансгенных животных NAT1hom, NAT2hom и C57Bl/6.

Fig. 1. Comparative histogram of the plasma cytokine profile of laboratory transgenic animals NAT1hom, NAT2hom and C57Bl/6.

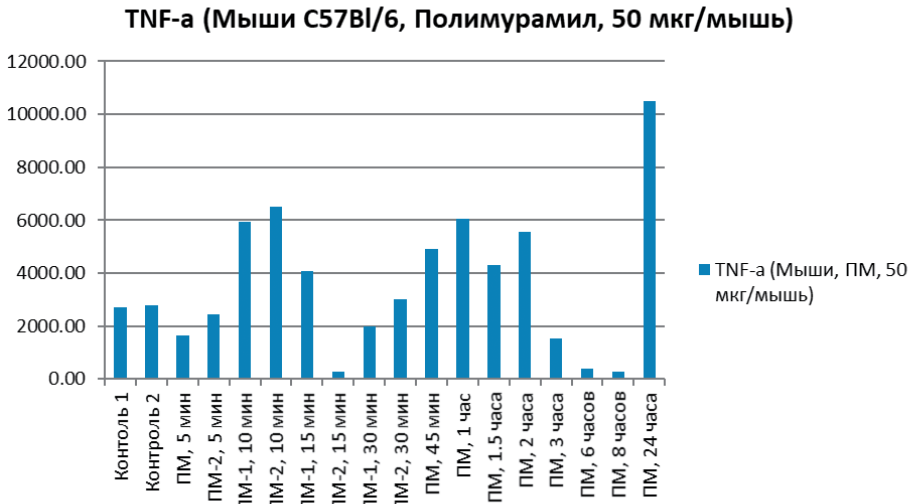


Рис. 2. Динамика концентрации ФНО-альфа (TNF-α) в плазме крови мышей C57Bl/6 через 5–10–15–30–45 мин, 1–1.5–2–3–8–24 ч после однократного введения полимурамилла в дозе 50 мкг/мышь.

Fig. 2. Dynamics of the concentration of TNF-alpha (TNF-α) in the blood plasma of C57Bl/6 mice after 5–10–15–30–45 min, 1–1.5–2–3–8–24 h after a single injection of Polymuramyl at a dose of 50 µg per mouse.

Установлено, что фармакодинамика полимурамилла, оцениваемая по уровню ФНО-альфа, имеет несколько максимумов: первый после в/м введения (50 мкг/мышь) по ФНО-альфа наблюдается при 10 мин, следующий — при 45–60 мин и максимальный — на 24 ч (рис. 2). Подобный волнообразный характер продукции TNF-α и ряда др. цитокинов (IL-6, IL-10) является отличительной особенностью фармакокинетики и фармакодинамики иммуномодулирующего действия препарата. Причинами таких закономерностей могут быть поликомпонентность состава полимурамилла, отличающая его от индивидуальных соединений мурамилпептидов (МДП, глюкозаминил-МДП и др.).

Нами установлено, что полимурамил в условиях иммуносупрессивной модели оказывает восстанавливающее действие на уровень циркулирующего ФНО-альфа, увеличивая в рамках эксперимента продукцию цитокина в 10–30 раз по сравнению с группой животных, получивших только иммуносупрессор — такролимус. Замечено, что данные эффекты развиваются в короткие

промежутки времени (до 2 ч) и сопряжены с выживаемостью животных (рис. 3).

В качестве модели острого воспаления использовалась модель экспериментального гриппа на мышах. Было показано, что у животных с экспериментальным гриппом внутримышечное введение полимурамилла в дозе 10 мкг/мышь подавляет продукцию TNF-α, приближая его значение к уровню продукции TNF-α интактных животных.

Выводы

Впервые получены данные цитокинового профиля трансгенных гуманизированных мышей NAT1hom, NAT2hom. Выявлена иммунологическая сопоставимость данных цитокинового статуса трансгенных линий с открытыми базами данных по цитокиновому статусу человека.

Впервые получены экспериментальные данные фармакодинамики иммунологического лекарственного средства — полимурамилла.

Результаты исследования фармакодинамики полимурамилла по изменению уровней

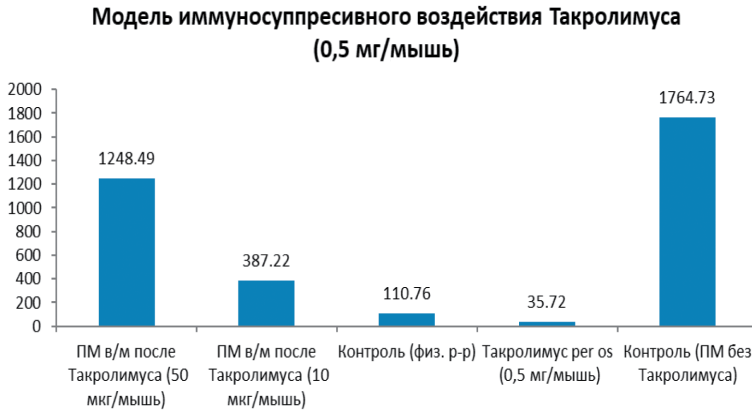


Рис. 3. Уровень ФНО-альфа в образцах плазмы крови мышей после введения полимурамила (ПМ), 50 и 10 мкг/мышь, с предварительно индуцированной иммуносупрессией введением такролимуса.

Fig. 3. Levels of TNF-alpha in mouse plasma samples after administration of Polymuramil (PM), 50 and 10 µg per mouse, with pre-induced immunosuppression with Tacrolimus.

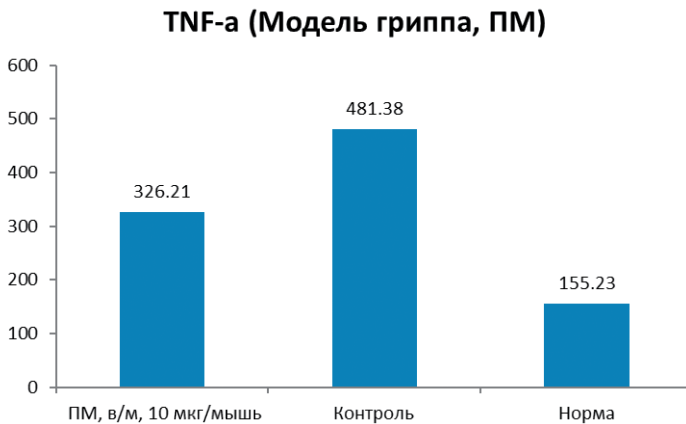


Рис. 4. Уровень TNF-а в плазме крови мышей Balb/c (ПМ, в/м, 10 мкг/мышь — уровень TNF-а в плазме крови мышей после заражения гриппом и 5 ежедневных введений препарата полимурамил внутримышечно в дозе 10 мкг/мышь. Контроль — уровень TNF-а в плазме крови мышей после заражения гриппом. Норма — уровень TNF-а в плазме крови здоровых мышей).

Fig. 4. Levels of TNF-alpha in Balb/c mouse plasma (PM, IM, 10 µg per mouse — the level of TNF-alpha in the mouse blood plasma after infecting with influenza viruses and 5 daily Polymuramil injections intramuscularly at a dose of 10 µg per mouse. Control — the level of TNF-alpha in the mouse blood plasma after infecting with influenza viruses. Norm — the level of TNF-alpha in the blood plasma of healthy mice).

ряда цитокинов и хемокинов (ФНО-альфа, IL-6, IL-10) в плазме крови подтверждают иммуномодулирующее действие препарата. Наличие нескольких максимумов концентрации большинства изученных цитокинов в плазме крови после введения полимурамила может отражать наличие в составе этого иммуномодулятора трех действующих

компонентов и объясняться фазным включением в высвобождение/продукцию цитокинов разных по локализации в организме клеток-продуцентов. Первый пик, вероятно, связан с выбросом цитокинов в зоне первичного введения препарата и клетками крови, второй пик — с высвобождением цитокинов в тканях в результате тканевого распределе-

ния полимурамила из системного кровотока. Третий пик, обнаруженный в отношении ФНО-альфа и некоторых других цитокинов через 24 ч после введения препарата, можно трактовать как активацию синтеза этих молекул *de novo*.

Эксперимент на мышинной модели гриппа подтверждает иммуномодулирующую активность полимурамила при внутримышечном введении в условиях острого воспаления. Внутримышечное введение полимурамила достоверно снижает избыточную

продукцию провоспалительного цитокина TNF- α .

На модели иммуносупрессии, индуцированной такролимусом, полимурамил оказывал восстанавливающее действие на уровень циркулирующего ФНО-альфа, увеличивая в рамках эксперимента продукцию цитокина в 10–50 раз по сравнению с группой животных, подверженных иммуносупрессии. Установлено, что данные эффекты развиваются в короткие промежутки времени (до 2 ч).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А. К фармакодинамике производных флуорена — тилорона и ингината — на основе ингибирования N-ацетилтрансфераз и продукции цитокинов. *Биомедицина*. 2017;(4):34–45. [Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A. K farmakodinamike proizvodnykh fluorena — tilorona i inginata — na osnove ingibirovaniya N-atsetiltransferaz i produktsii tsitokinov [To the pharmacodynamics of fluorene — thylorone and ininate derivatives — based on inhibition of N-acetyltransferases and cytokine production]. *Biomedicine*. 2017;(4):34–45. (In Russian)].
2. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2) человека. *Биомедицина*. 2016;(1):4–18. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Karkischenko N.N., Dulya M.S., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., Lazarev V.N., Maksimenko S.V., Petrova N.V., Stolyarova V.N., Trubitsyna T.P. Molekulyarno-geneticheskiye aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshey s integrirovannymi genami N-atsetiltransferazy (NAT1 i NAT2) cheloveka [Molecular and genetic aspects of technology for producing transgenic mice with integrated N-acetyltransferase genes (NAT1 and NAT2) in humans]. *Biomedicine*. 2016;(1):4–18. (In Russian)].
3. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Колоскова Е.М., Каркищенко В.Н. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;(3):4–22. [Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Koloskova E.M., Karkischenko V.N. Sozdanie gumanizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological studies (successes, failures and prospects)]. *Biomedicine*. 2014;(3):4–22. (In Russian)].
4. Петрова Н.В., Слободенюк В.В. Молекулярно-эпигенетические исследования трансгенных мышей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека в фармакологии. *Экспериментальная и клиническая фармакология. Прил. Мат-лы к 6-й Межд. конф. «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам»*. 2015;78:49. [Petrova N.V., Slobodenyuk V.V. Molekulyarno-epigeneticheskiye issledovaniya transgennykh myshey s integrirovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka v farmakologii [Molecular and epigenetic studies of transgenic mice with integrated human NAT1 and NAT2 genes in pharmacology]. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. Pril. Mat-ly k 6-j Mezhd. konf. «Biologicheskiye osnovy individual'noy chuvstvitel'nosti k psikhotropnym sredstvam»* [Experimental and clinical pharmacology. Application. Materials for the 6th International Conference "Biological Basis of Individual Sensitivity to Psychotropic Drugs"]. 2015;78:49. (In Russian)].
5. Рябых В.П., Колоскова Е.М., Езерский В.А., Трубицина Т.П., Максименко С.В. О перспективах получения трансгенных мышей-биомоделей для фармакологических и токсикологических исследований. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2015;2:5–22. [Ryabykh V.P., Koloskova E.M., Ezerskiy V.A., Trubitsyna T.P., Maksimenko S.V. O perspektivakh polucheniya transgennykh myshey-biomodeley dlya farmakologicheskikh i toksikologicheskikh issledovaniy [On the prospects for obtaining transgenic mice-biomodels for pharmacological and toxicological studies]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* [Problems of the biology of productive animals]. 2015;2:5–22. (In Russian)].
6. Хаитов Р.М., Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Роль паттерн-распознающих рецепторов во врожден-

- ном и адаптивном иммунитете. *Иммунология*. 2009;30:66–76. [Khaitov R.M., Pashchenkov M.V., Pinenin B.V. Rol' pattern-raspoznayushchikh retseptorov vo vrozhdennom i adaptivnom immunitete [The role of pattern-recognizing receptors in innate and adaptive immunity]. *Immunology*. 2009;30:66–76. (In Russian)].
7. Banchereau J., Briere F., Caux C., et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18:767–811.
 8. Bernasconi N.L., Onai N., Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*. 2003;101:4500–04.
 9. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. *Nature*. 2004;430:257–263.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Дуля Максим Сергеевич*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: mdulya@gmail.com

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

Хвостов Даниил Владиславович, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: ageldinov@gmail.com

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

Maxim S. Dulya*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mdulya@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@yandex.ru

Daniil V. Khvostov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К МОРФИНУ: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

А.В. Трофимов¹, А.Я. Рак¹, А.Г. Берзина^{2*}, Л.И. Ульянова², Н.Б. Гамалея²,
Т.А. Климова², Н.В. Станкова³

¹ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт
особо чистых биопрепаратов» ФМБА России
197110, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д. 7

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

³ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1

В работе описана методика получения антиидиотипических моноклональных антител (Ab2) к двум производным морфина. Представлены результаты исследования специфичности полученных антител с помощью иммуоферментного анализа. Проведена оценка биологической активности на модели пролиферации культур перевиваемой клеточной линии глиобластомы человека T98G *in vitro*.

Ключевые слова: антиидиотипические антитела, гибридома, клеточная культура, морфин, налоксон, синтез ДНК

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Трофимов А.В., Рак А.Я., Берзина А.Г., Ульянова Л.И., Гамалея Н.Б., Климова Т.А., Станкова Н.В. Антиидиотипические моноклональные антитела к морфину: получение, свойства и перспективы использования. *Биомедицина*. 2019;15(2):63–68. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-63-68>

Поступила 28.03.2019

Принята после доработки 03.04.2019

Опубликована 10.06.2019

ANTI-IDIOTYPIC MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST MORPHINE: PRODUCTION, PROPERTIES AND PROSPECTS OF USE

Alexandr V. Trofimov¹, Alexandra Ya. Rak¹, Asya G. Berzina^{2*}, Lyudmila I. Ulyanova²,
Natalia B. Gamaleya², Tatyana A. Klimova², Natalia V. Stankova³

¹ State Research Institute of Highly Pure Biopreparations
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
197110, Russian Federation, Saint Petersburg, Pudozhskaya str., 7

² V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology
119034, Russian Federation, Moscow, Kropotkinskiy lane, 23

³ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Settlement Svetlye Gory, building 1

This paper describes a technique for producing anti-idiotypic monoclonal antibodies (Ab2) against two morphine derivatives. The specificity of the obtained antibodies was investigated using enzyme immunoassay. The biological activity of the antibodies was studied using an in-vitro model of human glioblastoma T98G cell line proliferation.

Keywords: anti-idiotypic antibodies, hybridoma, cell culture, morphine, naloxone, DNA synthesis

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

For citation: Trofimov A.V., Rak A.Ya., Berzina A.G., Ulyanova L.I., Gamaleyeva N.B., Klimova T.A., Stanikova N.V. Anti-Idiotypic Monoclonal Antibodies against Morphine: Production, Properties and Prospects of Use. *Journal Biomed.* 2019;15(2):63–68. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-63-68>

Submitted 28.03.2019

Revised 03.04.2019

Published 10.06.2019

Введение

Разработка вакцины для лечения опиатной зависимости имеет важное практическое значение, поскольку предупреждение дальнейших рецидивов у больных, прошедших курс лечения, является наиболее эффективной мерой. В качестве одного из перспективных направлений может рассматриваться использование для вакцинации иммунобиологических препаратов, полученных на основе антиидиотипических (вторичных) антител, являющихся белковыми имитаторами исходных антигенов [2, 4]. Для получения антиидиотипических антител к двум производным морфина нами были использованы первичные моноклональные антитела (MAb1) к 3-карбоксиметильному (КММ) и 6-гемисукцинильному (ГСМ) производным морфина, а именно — производным по гидроксильным остаткам при атомах углерода в 3-м и 6-м положениях фенантренового кольца молекулы морфина.

Цель работы — получение, характеристика, проверка иммуногенных и морфиноподобных свойств антиидиотипических моноклональных антител (Ab2) к двум производным морфина.

Материалы и методы

Мышей линии Balb/c иммунизировали ранее полученными MAb1 к двум производным морфина (клоны 3K11 и 6G1,

распознающие разные участки молекулы морфина) [1]. Антитела, конъюгированные с гемоглобином, вводили в дозе 10 мкг/мышь в смеси с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ). На 30-й день животным вводили внутривенно 5 мкг MAb1 в физ. р-ре, после чего (на 4-й день) животных умерщвляли и из паховых и брюшных лимфоузлов выделяли спленциты и лимфоциты. Затем клетки смешивали с клетками миеломы мыши линии SP 2/0 в соотношении 2:1 и проводили гибридизацию по методу Мильштейна — Келера. Для выделения аффинных антиидиотипических (AI, Ab2) антител из асцитных жидкостей были приготовлены иммуносорбенты 3K11-сефароза и 6G1-сефароза. Специфичность моноклональных Ab2 антител определяли с помощью ИФА в реакции с пероксидазными конъюгатами MAb1 — 3K11 и 6G1. Ab3 иммунный ответ изучали на кроликах породы советская шиншилла. Схема иммунизации представлена в табл. 1.

Титр Ab3 антител в сыворотках крови определяли с помощью непрямого метода ИФА, используя в качестве антигена на твердой фазе конъюгат фенилазопроизводного морфина по 2-му атому углерода с лизоцимом (ФАМ-лиз).

Для оценки Ab2 антител по способности проявлять морфиноподобные свойства *in vitro* была использована культура глиобластомы человека линии T98G с ярко

Таблица 1. Схема иммунизации кроликов для получения Ab3 антительного ответа
Table 1. A scheme describing immunization of rabbits for obtaining the antibody Ab3 response

Вводимый антиген	Способ введения антигена	
	1-я инъекция — 0 день	2-я инъекция — 15-й день
АИ-K11B АИ-G1	0,2 мг антигена в 2 точки внутримышечно с ПАФ, 1:1	0,2 мг антигена в 4 точки подкожно вдоль хребта с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ), 1:1
	3-я инъекция — 30-й день	4-я инъекция — 45-й день
	0,2 мг антигена в 4 точки подкожно вдоль хребта с НАФ (1:1)	0,2 мг антигена в 2 мл физ. р-ра внутривенно

выраженной экспрессией опиоидных рецепторов. Биологический эффект Ab2 антител в широком диапазоне доз (от 0,39 до 25 мкг на 1 мл полной питательной среды — ППС) проверяли по их способности влиять на синтез ДНК в культуре клеток в сравнении с действием морфина и налоксона, обладающих агонистическим и антагонистическим действием по отношению к μ -опиоидным рецепторам соответственно. Культивирование клеток и постановку экспериментов проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах, как было указано ранее [3]. Интенсивность биологического эффекта антител и ПАВ оценивали по активности синтеза ДНК в клеточных культурах, которую измеряли по скорости включения метил- $^3\text{H}_1$ -тимидина во вновь синтезируемую ДНК и выражали в импульсах в мин (имп/мин).

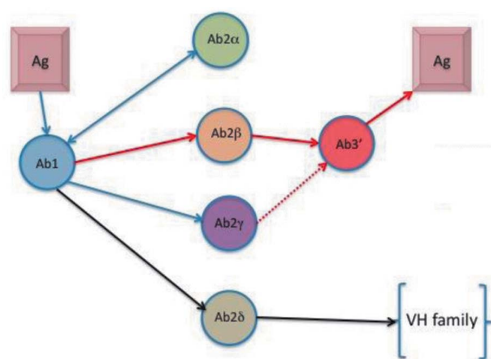


Рис. 1. Каскад антител (Ab), образующихся при иммунизации.
Fig. 1. The cascade of the antibodies (Ab) formed during immunization.

Результаты и их обсуждение

В результате проделанной работы были получены 3 клон-продуцента Ab2, из которых два (Ab2-K11A и Ab2-K11B), по данным конкурентного ИФА, продуцировали антитела, специфичные к MAb1-3K11, тогда как клон Ab2-G1 явился продуцентом Ab2, распознающих MAb1-6G1. Известно, что в результате иммунизации первичным антигеном, согласно теории Эрне, образуется целый каскад идиотипов антител (рис. 1), причем Ab3 антитела обладают Ab1-подобными свойствами (рис. 2).

Иммунизация кроликов полученными Ab2 антителами индуцировала продукцию Ab3 антител у животных. Проверка специфичности выделенных Ab3 антител методом ИФА с лизоцимными конъюгатами трех производных морфина (табл. 2) показала, что они обладают способностью

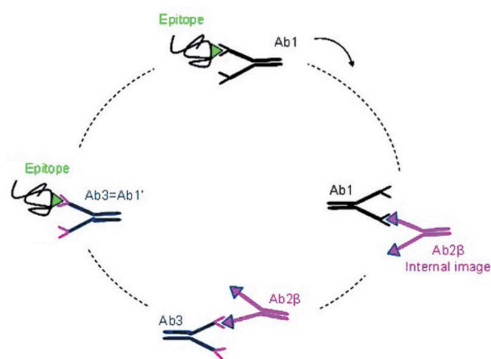


Рис. 2. Специфичность Ab1, Ab2 и Ab3 антител первичным антигеном (Ag).
Fig. 2. The specificity of the Ab1, Ab2 and Ab3 antibodies to the primary antigen (Ag).

связываться с теми производными, которые были использованы для получения Ab1 антител (КММ, ГСМ), а также с ФАМ-лиз. Полученные результаты свидетельствуют также о принадлежности Ab3 антител к β 2-типу.

Изучение динамики накопления Ab3 антител в сыворотке кроликов, иммунизированных моноклональными Ab2 антителами, показало, что пик продукции Ab3 антител приходится на 31-е сут от последней иммунизации (табл. 3), при этом концентрация антител достигала 31692 нг/мл, что было существенно выше ранее полученных результатов, когда для иммунизации животных использовались поликлональные Ab2 антитела (200 нг/мл) к тем же антигенам.

Проверка биологической активности антиидиотипических антител (Ab2) на культуре перевиваемой линии глиобластомы человека T98G, клетки которой несут на своей поверхности опиоидные κ - и μ -рецепторы, показала, что антитела Ab2-K11B и Ab2-G1, используемые в диапазоне доз 0,39–10 мкг/мл, активируют подобно морфину синтез ДНК в культуре клеток T98G (рис. 3). Причем максимальная интенсивность синтеза ДНК в клетках линии T98G у антиидиотипических антител АИ-K11B, полученных на основе Ab1-K11B, достигалась при концентрации 6,25 мкг/мл, аналогично морфину, тогда как у АИ-G1, полученных на основе Ab1-G1 антител, этот эффект был более выражен в сравнении как с морфином, так и с АИ-K11B антителами, и достигал максимума при концентрации 3,125 мкг/мл. Далее мы попытались выяснить, является ли механизм действия Ab2 антиидиотипических антител в культуре клеточной линии T98G аналогичным действию морфина, который активирует клетки, главным образом, через μ -опиоидные рецепторы. В клеточные культуры одновременно с морфином или Ab2 антиидиотипическими антителами был введен налоксон, внесение

Таблица 2. Иммунологическая специфичность Ab3 антител

Table 2. The immunological specificity of Ab3 antibodies

Наименование антител	Антиген, иммобилизованный на плате		
	КММ-лиз.	ФАМ-лиз.	ГСМ-лиз.
Ab1 K11	+	+	–
Ab1 G1	–	–	+
Ab3 АИ-K11B	+	+	+
Ab3 АИ-G1	+	+	+

Таблица 3. Динамика образования Ab3 антител

Table 3. The dynamics of formation of Ab3 antibodies

Сутки	АИ-K11B	АИ-G1
	Ab3 нг/мл	Ab3 нг/мл
16	4804	9964
28	12 636	19 158
31	24 756	31 692
37	33 531	28 634
50	30 864	19 646

которого в культивируемые лимфоциты человека, как мы показали ранее, нейтрализует эффект морфина, стимулирующий синтез ДНК в этих культурах [3]. Результаты оценки нейтрализующего эффекта налоксона представлены на рис. 3, из которого видно, что налоксон полностью блокирует не только стимулирующий эффект синтеза ДНК в культурах T98G, вызванный морфином, но также полностью устраняет эффект стимуляции, вызванный АИ антителами, при всех испытанных концентрациях препаратов.

Закключение

Таким образом, полученные нами моноклональные антиидиотипические Ab2 антитела к двум производным морфина по своей способности индуцировать иммунный Ab1-подобный Ab3 ответ могут рассматриваться в дальнейшем как белковый имитатор производных морфина. Специфичность выделенных из кроличьей сыворотки крови Ab3 антител шире, чем

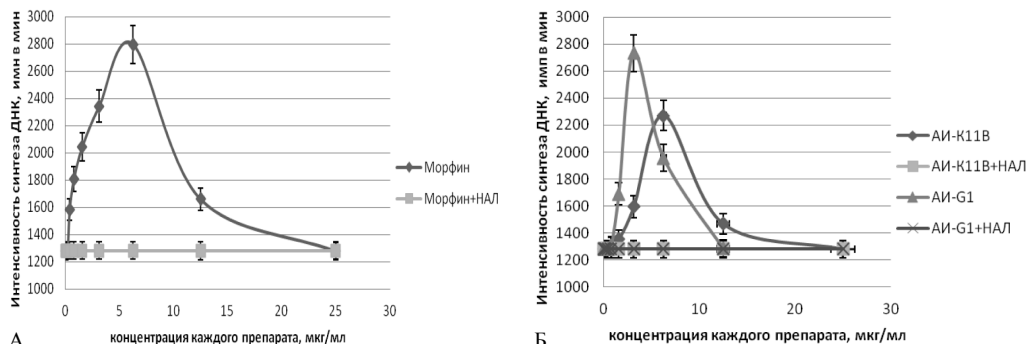


Рис. 3. Оценка биологической активности морфина (А) и Ab2 (Б) в культуре клеток T98G.
Fig. 3. The assessment of the biological activity of morphine (A) and Ab2 (Б) in a T98G cell culture.

у исходных моноклональных Ab1 антител. Пик продукции Ab3 антител приходится на 30–35 дни после последней иммунизации. У Ab2 антител, полученных на основе Ab1-K11В антител, максимальная интенсивность индукции пролиферативного ответа в клетках линии T98G достигается при концентрации 6,25 мкг/мл, как в слу-

чае морфина, а у полученных на основе G1 антител — при концентрации 3,125 мкг/мл. Таким образом, мы установили, что AI-K11В и AI-G1, как и морфин, оказывают стимулирующее влияние на пролиферативные процессы перевиваемой клеточной линии T98G, что свидетельствует об их морфиноподобных свойствах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Сергеева В.Е., Трофимов А.В., Кротов Г.И., Ульянова Л.И. Получение поликлональных и моноклональных антител к двум производным морфина. *Вопросы наркологии*. 2016;(11–12):39–53. [Berzina A.G., Gamaleya N.B., Sergeeva V.E., Trofimov A.V., Krotov G.I., Ul'yanova L.I. Poluchenie poliklonal'nyh i monoklonal'nyh antitel k dvum proizvodnym morfina [Preparation of polyclonal and monoclonal antibodies to two morphine derivatives]. *Voprosy narkologii [The questions of narcology]*. 2016;(11–12):39–53. (In Russian)].
- Гамалея Н.Б., Берзина А.Г. Вакцина от наркотиков — новое перспективное направление профилактики злоупотребления психоактивными веществами. *Наркология*. 2010;(11):70–83. [Gamaleya N.B., Berzina A.G. Vaksina ot narkotikov — novoe perspektivnoe napravlenie profilaktiki zloupotrebleniya psikhoaktivnymi veshchestvami [Drug vaccine — a new promising area of prevention of substance abuse]. *Narcology*. 2010;(11):70–83. (In Russian)].
- Гамалея Н.Б., Ульянова М.А., Берзина А.Г., Кротов Г.И., Ульянова Л.И. Оценка биологической активности морфина, лоперамида и налоксона на культуре перевиваемой клеточной линии человека T98G. *Наркология*. 2017;(1):39–44. [Gamaleya N.B., Ul'yanova M.A., Berzina A.G., Krotov G.I., Ul'yanova L.I. Otsenka biologicheskoy aktivnosti morfina, loperamida i naloksona na kul'ture perevivaemoj kletochnoj linii cheloveka T98G [Assessment of biological activity of morphine, loperamide and naloxone on human cell line culture T98G]. *Narcology*. 2017;(1):39–44. (In Russian)].
- Schabacker D.S., Kirschbaum K.S., Segre M. Exploring the feasibility of an anti-idiotypic cocaine vaccine: analysis of the specificity of anticocaine antibodies (Ab1) capable of inducing Ab2β anti-idiotypic antibodies. *Immunology*. 2000;100:48–56.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Трофимов Александр Викторович, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;

e-mail: honeyagaric@yandex.ru

Alexandr V. Trofimov, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: honeyagaric@yandex.ru

Рак Александра Яковлевна, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России;

Alexandra Ya. Rak, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

Берзина Ася Григорьевна*, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;

e-mail: berzina07@mail.ru

Asya G. Berzina*, Cand. Sci. (Biol.), V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology;

e-mail: berzina07@mail.ru

Ульянова Людмила Ивановна, д.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;

e-mail: oulyanova.46@mail.ru

Lyudmila I. Ulyanova, Dr. Sci. (Biol.), V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology;

e-mail: oulyanova.46@mail.ru

Гамалея Наталия Борисовна, д.м.н., проф., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;

e-mail: natgam@mail.ru

Natalia B. Gamaleya, Dr. Sci. (Med.), Prof., V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology;

e-mail: natgam@mail.ru

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

Tatyana A. Klimova, Cand. Sci. (Biol.), V. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology;

Станкова Наталия Владимировна, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;

e-mail: sinayva@yandex.ru

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

e-mail: sinayva@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-69-74>



METHODS FOR ESTIMATING NEUROLOGICAL DISTURBANCES IN EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA

Elizaveta I. Bon^{*}, Nataliya Ye. Maksimovich

Grodno State Medical University
230009, Republic of Belarus, Grodno, Gorkogo str., 80

Investigation of the brain pathology in experimental ischemia requires adequate methods for assessing the neurological deficit that occurs in laboratory animals, including sensory-based and behavioural disorders. In this research, we aimed to compare motor and behavioural disorders in rats with partial and subtotal experimental cerebral ischemia. The rats modelled with cerebral ischemia are found to exhibit a decrease in muscle strength, resistance to hypoxia, motor and emotional activity. The animals with incomplete cerebral ischemia demonstrated more pronounced sensory-based motor and behavioural disorders compared both with those modelled with partial cerebral ischemia and, in particular, with the control group.

Keywords: cerebral ischemia, sensomotor and behavioural disorders, rats

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

Funding: The study was funded by the Belarusian Foundation for Basic Research (contract No. M18M-036) grant for reagents and animals.

For citation: Bon E.I., Maksimovich N.Ye. Methods for Estimating Neurological Disturbances in Experimental Cerebral Ischemia. *Journal Biomed.* 2019;15(2):69–74. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-69-74>

Submitted 08.10.2018

Revised 25.02.2019

Published 10.06.2019

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Е. И. Бонь^{*}, Н. Е. Максимович

УО «Гродненский государственный медицинский университет»
230009, Республика Беларусь, Гродно, ул. Горького, д. 80

Изучение патологии головного мозга при экспериментальной ишемии обуславливает потребность в адекватных способах оценки возникающего у лабораторных животных неврологического дефицита, включающего сенсомоторные и поведенческие нарушения. Целью работы явилось сравнительное изучение двигательных и поведенческих нарушений у крыс с частичной и субтотальной экспериментальной церебральной ишемией. Установлено, что крысы после экспериментальной церебральной ишемии обладали меньшей мышечной силой, были менее устойчивы к гипоксии, проявляли меньшую двигательную и эмоциональную активность. У животных с субтотальной церебральной ишемией наблюдались более выраженные сенсомоторные и поведенческие нарушения по сравнению с крысами, которым моделировали частичную церебральную ишемию и, особенно, по сравнению с контрольными животными.

Ключевые слова: церебральная ишемия, сенсомоторные и поведенческие нарушения, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект М18М-036).

Для цитирования: Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Методы оценки неврологических нарушений при экспериментальной церебральной ишемии. *Биомедицина*. 2019;15(2):69–74. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-69-74>

Поступила 08.10.2018

Принята после доработки 25.02.2019

Опубликована 10.06.2019

Introduction

The expediency of studying the pathology of the brain in experimental ischemia necessitates adequate methods for assessing the neurological deficit that occurs in laboratory animals, including various sensory and behavioural disorders. A number of methods can be used to study the degree of sensory-based motor and behavioural disorders in animals, such as the forced swimming, muscle strength, open field tests, as well as those for evaluating the modified indicators of the depth of a neurological deficit [3]. Among other popular methods are the Bederson, gas exposure, angular, paw-pulling tests.

This article sets out to generalize the available literature data on contemporary approaches to assessing sensory-based motor reflexes, learning and memory abilities in experimental animals at different ages. In the early postnatal period, reflexes are assessed using such methods as the slip on the surface, negative geotaxis, avoidance of falling, reaction to acoustic stimuli, olfactory reaction and muscle strength tests.

Sensory-based motor and behavioural disorders have been extensively studied using various models of cerebral ischemia (CI) [7–10]; however, the data obtained in these works has not thus far been properly generalized.

Research works devoted to the investigation of CI effects have identified a number of sensory-based motor disorders, including a decrease in motor activity when an animal is suspended by the tail, walking along a circle on a horizontal surface, dis-coordination of movements during walking along the bar, a decrease in the expression of unconditioned reflexes,

animals' inability to navigate through space. Local ischemic damage to the anterior parts of the frontal cortex of the rat brain leads to disruption in the production, preservation and reproduction of conditioned reflexes, while damage to the posterior parts of the frontal cortex is accompanied by a loss of the ability to navigate in T-shaped labyrinths [8–10].

The purpose of this research was a comparative study of motor and behavioural disorders in rats with partial and subtotal experimental cerebral ischemia.

Tests for studying the maturation of the nervous system in newborns

In new-born rat pups, methods for assessing the development of sensory-based motor reflexes comprise the slip on the surface, negative geotaxis, avoidance of falling, reaction to acoustic stimuli, olfactory reaction and muscle strength tests. These measurements can be carried out both multiple times to trace dynamic changes and on a single occasion, e.g. on the supposed day of maturation of the studied reflex in intact animals [1, 26–28].

Tests for studying sensory-based motor disorders in adult animals

The degree of sensory-based motor disorders in adult rats is identified using a diversity of methods, including the Bederson, Garcia, angular, pulling-the-paw, open-field tests, as well as that for assessing the modified depth indices of a neurological deficit [3, 5–7, 11, 14, 15, 17–25].

Materials and methods

The experiments were performed on 30 female non-native white rats weighing

230±20 g. All the requirements of the 2010/63/EU Directive of the European Parliament and the Council of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes were observed during the experiments [16]. The animals were kept in an air-conditioned room (22°C) with mixed lighting under standard vivarium conditions implying free access to feed and water. One vivarium cage housed no more than 5 animals. The choice of experimental animals was determined by the similarity between rats and humans in terms of the brain angioarchitectonics. Before the research, all the necessary conditions were met. Thus, 60 minutes before testing, the animals were kept in a quiet, poorly lit place, without any regrouping and changes in feeding and other conditions [4]. Subtotal cerebral ischemia (SCI) was modelled by a stepwise ligation of a carotid artery, which manipulation promoted the survival of animals compared to those with simultaneous bandaging. Partial cerebral ischemia (PCI) was modelled by ligation of one common carotid artery (CCA) under intravenous thiopental anaesthesia (40–50 mg/kg).



Fig. Muscle strength evaluation.

Рис. Оценка мышечной силы.

The second group consisted of rats, which were simulated with SCI 7 days following PCI by ligation of the second (right) CCA [4]. The control group (control) comprised false-operated animals. The tests were performed 5 days following the surgery.

The ischemic damage to the brain was estimated by assessing the animals' emotional state, behaviour and motor activity. To this end, the open field, muscle strength and forced swimming tests were applied.

Muscular strength was assessed by placing a rat on a metal mesh with a length of 60 cm and a centimetre scale, and determining the time when the animal falls off after lifting the mesh to a horizontal position (by 90°).

In the forced swimming test, the animals were placed in a glass tank filled with water (21°C) for determining the time during which the animal can maintain swimming and floating behaviour.

Statistical processing of the obtained data was carried out using the Statistica 10.0 program for Windows (StatSoft, Inc., USA). The values obtained were analysed by non-parametric statistics. The quantitative data were presented as Me (LQ; UQ), where Me was the median, LQ — the value of the lower quartile; UQ — the value of the upper quartile. Differences between the control and experimental groups were considered significant at $p < 0.05$ (the Kruskal — Wallis and Mann — Whitney tests with the Bonferroni correction) [1].

Results

A significant decrease in muscle strength was observed in both groups of the animals with CI compared to the control group. Thus, this indicator decreased by 75% ($p < 0.05$) and 95% ($p < 0.05$) in the PCI and SCI groups, respectively. Muscular strength in rats with PCI was 5 times more pronounced than in those with SCI (Table).

In addition, the rats with PCI showed a greater resistance to the load-induced hyp-

Table. Indicators of sensory-based motor and behavioural tests. The quantitative data are presented in the form of Me (LQ; UQ)

Таблица. Показатели сенсомоторных и поведенческих тестов. Количественные данные представлены в виде медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

Group	Muscle strength	Forced swimming test	Indicators			
			Number of crossed squares	Number of short washings	Climbing	Number of defecation and urination acts
Control	20 (15; 24)	21 (18; 23)	67 (64; 72)	6 (5.1; 7.2)	9 (8; 9.4)	5 (4.6; 6.5)
PCI	5 (4.7; 5.9)*	12 (15; 12.3)*	54 (52; 59)*	4 (3.5; 4.3)*	6 (5.8; 6.4)*	3 (2.5; 3.6)*
SCI	1 (0.5; 1.2)*#	5 (4.5; 5.7)*#	24 (22; 28)*#	2 (1.6; 2.4)*#	3 (2.6; 3.2)*#	2 (1.2; 2.3)*#

Note: * — $p < 0.05$ compared to the control, # — $p < 0.05$ compared to the PCI.

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # — $p < 0,05$ по сравнению с частичной церебральной ишемией.

oxia in the forced swimming test. The time of their floating on the surface exceeded that in the animals with SCI by 58% ($p < 0.05$). Compared to the control group, the floating time was by 57% ($p < 0.05$) and 76% ($p < 0.05$) lower in the PCI and SCI groups, respectively.

The assessment of motor activity by the open field test also revealed the presence of motor deficiency in rats with CI. In comparison with the control group, the rats with PCI and SCI demonstrated a decrease in crossed squares by 20% ($p < 0.05$) and 64% ($p < 0.05$), respectively. The motor activity in the horizontal plane test was higher in rats with PCI by 44% ($p < 0.05$) than in the SCI group. In comparison with the control group, the number of short washings in the rats with PCI and SCI was 33% ($p < 0.05$) and 67% ($p < 0.05$) lower, respectively. The rats with PCI performed 50% ($p < 0.05$) more washings compared to the SCI group.

Compared to the control group, the weight loss in the rats with PCI and SCI was 33% ($p < 0.05$) and 67% ($p < 0.05$) lower. The rats with PCI made 50% more racks in comparison with the SCI group ($p < 0.05$).

The rats with PCI and SCI demonstrated a 40% ($p < 0.05$) and 60% ($p < 0.05$) decrease in the number of defecation and urination acts

compared to the control. In terms of this indicator, the rats with PCI differed from animals with SCI by 33% ($p < 0.05$).

Long-term washings and rearing posts were observed only in intact animals.

Conclusions

The rats after experimental CI have demonstrated a decrease in muscle strength, resistance to hypoxia, motor and emotional activity. In animals with SCI, more pronounced sensorimotor and behavioural disorders have been observed compared to those modelled with PCI. The morphological basis of the revealed disorders is found to be damage to the neurons of the brain, leading both to the destruction of physiological functional connections and physiological systems, as well as to the emergence of pathogens. The latter causes the destabilization of nervous processes (coordinated activity of excitation and inhibition), which subsequently results in the disruption of brain cognitive functions. Another reason for these disorders is an imbalance between the levels of biogenic amines and neuromediators in brain structures, which act as endogenous pathogenic factors and determine the nature and severity of ischemic damage [2, 12, 13].

REFERENCES | СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [Batin N.V. *Komputornii statisticheskii analiz dani- nich: uch.-metod. posob. [Computer statistical anal- ysis of data]*. Minsk: In-t podgot. nauch. kadrov NAN Belarusi [Institute for the training of scientific personnel Belarus NSA], 2008. 160 p. (In Russian)]. Батин Н.В. *Компьютерный статистический ана- лиз данных: уч.-метод. пособ.* Минск: Ин-т подгот. науч. кадров НАН Беларуси, 2008. 160 с.
- [Bon L.I., Maksimovich N.Ye., Zimatkin S.M. Mor- fofunktsional'nyye narusheniya v gippokampe kryis posle subtotal'noy ishemii [Morphofunctional disorders in the hippocampus of rats after subto- tal ischemia]. *Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii [Bulletin of Smolensk State Medical Academy]*. 2018; 17(1):24–29. (In Russian)]. Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Зиматкин С.М. Мор- фофункциональные нарушения в гиппокампе крыс после субтотальной ишемии. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2018; 17(1):24–29.
- [Buresh Ya., Bureshova O., Houston D.P. *Metodiki i osnovnyye eksperimenty po izucheniyu mozga i pov- edeniya [Techniques and basic experiments on the study of the brain and behavior]*. Moscow: Vysshaya shkola Publ., 1991. 332 p. (In Russian)]. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*. М.: Высшая школа, 1991. 345 с.
- [Butin A.A. Zakonomernosti izmeneniya sosudisto-ka- pillyarnoy seti kory bol'shogo mozga v otvet na ostru- yu tsebral'nuyu ishemiyu [Patterns of changes in the cerebrovascular capillary network of the cere- bral cortex in response to acute cerebral ischemia]. *Omskiy nauchnyy vestnik [Omsk Scientific Herald]*. 2004;26:46–57. (In Russian)]. Бутин А.А. Зако- номерности изменений сосудисто-капиллярной сети коры большого мозга в ответ на острую це- ребральную ишемию. *Омский научный вестник*. 2004;26:46–57.
- [Dayneko A.S., Shmonin A.A., Shumeyeva A.V., Kovalenko Ye.A., Mel'nikova Ye.V., Vlasov T.D. Metody otsenki nevrologicheskogo defitsita u kryis posle 30-minutnoy fokal'noy ishemii mozga na ran- nikh i pozdnykh srokakh postishemicheskogo perioda [Methods for assessing neurologic deficits in rats after a 30-minute focal cerebral ischemia in the early and late stages of the postischemic period]. *Regionalnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya [Regional blood circulation and microcirculation]*. 2014;(1):68–78. (In Russian)]. Дайнеко А.С., Шмонин А.А., Шумеева А.В., Коваленко Е.А., Мельникова Е.В., Власов Т.Д. Методы оценки неврологического де- фицита у крыс после 30-минутной фокальной ише- мии мозга на ранних и поздних сроках постише- мического периода. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2014;(1):68–78.
- [Zakharov V.V., Yakhno N.N. *Kognitivnyye ras- stroystva v pozhilom i starcheskom vozraste: Metod. posob. dlya vrachey [Cognitive disorders in the elderly and senile age: A manual for doctors]*. Moscow, 2005. 71 p. (In Russian)]. Захаров В.В., Яхно Н.Н. *Когни- тивные расстройства в пожилом и старческом возрасте: Метод. пособ. для врачей*. М., 2005. 71 с.
- [Zorina Z.A., Poletayeva I.I. *Zoopsikhologiya. Ele- mentarnoye myshleniye zhivotnykh [Zoopsychology. Elementary thinking of animals]*. Moscow: "Aspekt Press" Publ., 2001. 320 p. (In Russian)]. Зорина З.А., Полетаева И.И. *Зоопсихология. Элементарное мышление животных*. М.: «Аспект Пресс», 2001. 320 с.
- [Romanova G.A. Dizregulyatsionnyye narusheniya in- tegrativnoy deyatel'nosti mozga pri fokal'noy ishemii kory [Disregulatory disorders of brain integrative ac- tivity in focal coronary ischemia]. *Dizregulyatsion- naya patologiya [Disregulation pathology]*. Moscow: "Medicina" Publ., 2002. Pp. 605–615. (In Russian)]. Романова Г.А. Дизрегуляционные нарушения ин- тегративной деятельности мозга при фокальной ишемии коры. *Дизрегуляционная патология*. М.: «Медицина». 2002. С. 605–615.
- [Romanova G.A., Shakova F.M., Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U. Narusheniya obucheniya i pamyati, vyzvannyye fototrombozom prefrontal'noy kory golovno- go mozga kryis: efekty noopepta [Disturbances in learning and memory caused by photothrombosis of the prefrontal cerebral cortex of rats: effects of noo- rept]. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2002;(134):614–616. (In Russian)]. Романова Г.А., Шакова Ф.М., Гудашева Т.А., Островская Р.У. На- рушения обучения и памяти, вызванные фототром- бозом префронтальной коры головного мозга крыс: эффекты ноопепта. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2002;(134):614–616.
- [Sufianova G.Z. Usov L.A., Sufianov A.A., Shar- kin A.G., Rayevskaya L.Yu., Golubev S.S., Murik S.E. Maloinvazivnaya model' fokal'noy ishemii golovno- go mozga u kryis [A low-invasive model of focal cerebral ischemia in rats]. *Experimental and Clinical Phar- macology*. 2001;(64):63–67. (In Russian)]. Суфиано- ва Г.З., Усов Л.А., Суфианов А.А., Шапкин А.Г., Раевская Л.Ю., Голубев С.С., Мурик С.Э. Мало- инвазивная модель фокальной ишемии головного мозга у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2001;(64):63–67.
- Bederson J. Rat middle cerebral artery occlusion Eval- uation of the model and development of a neurological examination. *Stroke*. 1986;17:472–476.
- Chan P.H. Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neurochem. Res*. 2004;29:1943–49.
- Chen H., Sun D. The role of Na-K-Cl co-transporter in cerebral ischemia. *Neurol. Res*. 2005;27:280–286.

14. Cinque S., Zoratto F., Poleggi A., Leo D., Cerniglia L., Cimino S., Tambelli R., Alleve E., Gainetdinov R., Laviola G., Adriani W. Behavioral Phenotyping of Dopamine Transporter Knockout Rats: Compulsive Traits, Motor Stereotypies, and Anhedonia. *Front Psychiatry*. 2018;22:9–43.
15. Ehman K.D., Moser V.C. Evaluation of cognitive function in weanling rats: a review of methods suitable for chemical screening. *Neurotoxicol. Teratol.* 2006;28:144–161.
16. *European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*. ETS N 123. Strasbourg, 1986. Pp. 34–42.
17. Fashing P.J., Nguyen N. Behavior toward the dying, diseased, or disabled among animals and its relevance to paleopathology. *Int. J. Paleopathol.* 2011;1:128–129.
18. Hall C.S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1936;22:345–352.
19. Hattori K., Lee H., Hum P., Fahrig A. Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*. 2000;31:1939–44.
20. Prickaerts J., Fahrig A., Blokland T. Cognitive performance and biochemical markers in septum hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. *Behav. Brain Res.* 1999;102:73–88.
21. Rosińczuk J., Dymarek R., Całkosiński I. The protective action of tocopherol and acetylsalicylic acid on the behavior of rats treated with dioxins. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2018;27:5–14.
22. Satrom K., Ennis K., Sweis B. Matveeva T., Chen J., Hanson L., Maheshwari A., Rao R. Neonatal hyperglycemia induces CXCL10/CXCR3 signaling and microglial activation and impairs long-term synaptogenesis in the hippocampus and alters behavior in rats. *J. Neuroinflammation*. 2018;15:78–82.
23. Schaar K. Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & Translational Stroke Medicine*. 2010;2:13–18.
24. Schallert T., Upchurch M., Lobaugh N., Woodlee M.T. Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 1982;16:455–462.
25. Schallert T., Woodlee M.T. *Orienting and placing. In the Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. Oxford: Oxford University Press, 2005. Pp. 129–140.
26. Sestakova N., Puzserova A., Kluknavsky M., Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013;6:126–135.
27. Tilson H.A., Mitchell C.L. Neurobehavioral techniques to assess the effects of chemicals on the nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1984;24:425–450.
28. Vorhees C.V. Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.* 1997;20:387–399.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS | СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Elizaveta I. Bon*, Cand. Sci. (Biol.), Grodno State Medical University;
e-mail: asphodela@list.ru

Бонь Елизавета Игоревна*, к.б.н., УО «Гродненский государственный медицинский университет»;
e-mail: asphodela@list.ru

Nataliya Ye. Maksimovich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Grodno State Medical University;
e-mail: mne@grsmu.by

Максимович Наталия Евгеньевна, д.м.н., проф., УО «Гродненский государственный медицинский университет»;
e-mail: mne@grsmu.by

* Corresponding author / Автор, ответственный за переписку

СРАВНЕНИЕ ВЫРАЖЕННОСТИ ВОСПАЛЕНИЯ У КРЫС С ПЕРВИЧНОЙ РЕАКЦИЕЙ И ВТОРИЧНОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ НА ИНЪЕКЦИЮ ПОЛНОГО АДЬЮВАНТА ФРЕЙНДА

А. И. Матюшкин*, Е. А. Иванова, С. В. Алексеева, К. С. Качалов, Т. А. Воронина

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В. В. Закусова»
125315, Российская Федерация, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Модель хронического иммунного воспаления, вызванного введением полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) в заднюю лапу крыс, рассматривают в качестве модели ревматоидного артрита, при которой развивается повреждение суставов других конечностей, помимо той, в которую вводят ПАФ. Цель исследования — сравнить выраженность патологического процесса у крыс с первичной реакцией (отек левой задней лапы) и вторичной иммунологической воспалительной реакцией (отек правой задней лапы) на инъекцию ПАФ в левую заднюю лапу.

Воспаление моделировали введением 0,1 мл ПАФ в левую заднюю лапу аутобредных крыс. Отечность задних лап в области плюсны и голеностопного сустава, температуру кожи лап и массу животных регистрировали на 7, 14, 21, 28 сутки опыта. Порог болевой чувствительности оценивали на 15 сутки; гематологические показатели — на 14 и 28 сутки.

На 7 сутки после введения ПАФ у 11 из 20 животных развилась первичная реакция и вторичная иммунологическая реакция, у остальных крыс наблюдалось воспаление только левой задней лапы; температура кожи задних лап крыс с воспалением была выше, чем в контрольной группе. На 14 день опыта у крыс с моделью воспаления был зарегистрирован максимальный отек лап; повышен ряд гематологических показателей, причем более выражено — у крыс с генерализацией воспаления. В группах животных с первичной реакцией и с генерализацией воспалительного процесса снижался болевой порог. На 28 день у этих крыс наблюдалось уменьшение отека лап и нормализация гематологических показателей.

Таким образом, к 14 суткам после введения ПАФ у животных с первичной реакцией и с генерализацией воспалительного процесса наблюдается максимальная выраженность патологического процесса, которая снижается к 28 суткам. Это необходимо учитывать при планировании экспериментов по оценке фармакологической активности соединений на данной модели.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, полный адьювант Фрейнда, хроническое иммунное воспаление, подошвенный тест, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Матюшкин А.И., Иванова Е.А., Алексеева С.В., Качалов К.С., Воронина Т.А. Сравнение выраженности воспаления у крыс с первичной реакцией и вторичной иммунологической реакцией на инъекцию полного адьюванта Фрейнда. *Биомедицина*. 2019;15(2):75–87. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-75-87>

Поступила 27.01.2019

Принята после доработки 03.04.2019

Опубликована 10.06.2019

COMPARISON OF THE SEVERITY OF INFLAMMATION IN RATS WITH A PRIMARY REACTION AND SECONDARY IMMUNOLOGICAL REACTION TO AN INJECTION OF FREUND'S COMPLETE ADJUVANT

Alexander I. Matyushkin*, Elena A. Ivanova, Svetlana V. Alekseeva, Kirill S. Kachalov,
Tatyana A. Voronina

*Research Zakusov Institute of Pharmacology
125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya str., 8*

The model of chronic immune inflammation caused by the administration of Freund's complete adjuvant (CFA) into a hind paw of rats is used as a model of rheumatoid arthritis. Under this condition, the joints of other limbs, along with those subject to the action of CFA, are damaged. The aim of this study was to compare the severity of the inflammatory process in rats with a primary reaction (edema of the left hind paw) and a secondary immunological inflammatory response (edema of the right hind paw) towards a sub-plantar injection of CFA in the left hind paw of the experimental animals.

Inflammation was induced by the sub-plantar administration of 0.1 ml of CFA into the left hind paw of outbred rats. Such indicators as the edema of the metatarsus and the ankle joints of the hind paws, the weight of the animals and the skin temperature of the paws were recorded on the 7th, 14th, 21st and 28th day of the experiment. The pain threshold was recorded using a plantar test on the 15th day. Hematological parameters were assessed on the 14th and 28th day.

Both a primary reaction and a secondary immunological reaction was developed on the 7th day of the experiment in 11 out of 20 animals having received CFA, while the rest of the rats demonstrated inflammation exclusively in the left hind paw. On the 7th day of the experiment, the animals with inflammation showed a higher skin temperature in the hind paws compared to the control group. The maximum edema in the rats with a primary reaction and secondary immunological inflammatory response was recorded on the 14th day of the experiment. On the 14th day, the rats with induced inflammation showed an increase in a number of hematological parameters, with the elevation being more pronounced in the animals with generalized inflammation. As a result of inflammation, pain sensitivity increased in both groups of animals with induced inflammation. In these groups, both a decrease in the edema of the paws and the normalization of hematological parameters were observed on the 28th day of the experiment. It is concluded that the most pronounced inflammatory reaction has developed by the 14th day following CFA administration, with its intensity having reduced by the 28th day. These results might be useful when assessing the pharmacological activity of various compounds using this model.

Keywords: rheumatoid arthritis, Freund's complete adjuvant, chronic immune inflammation, plantar test, rats

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

For citation: Matyushkin A.I., Ivanova E.A., Alekseeva S.V., Kachalov K.S., Voronina T.A. Comparison of the Severity of Inflammation in Rats with a Primary Reaction and Secondary Immunological Reaction to an Injection of Freund's Complete Adjuvant. *Journal Biomed.* 2019;15(2):75–87. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-75-87>

Submitted 27.01.2019

Revised 03.04.2019

Published 10.06.2019

Введение

По заболеваемости на 100 тыс. населения болезни костно-мышечной системы (XIII класс МКБ-10) находятся на третьем месте после болезней органов дыхания и системы кровообращения [1]. Согласно данным Министерства здравоохранения РФ, в период с 2006 по 2017 гг. распространенность заболеваний костно-мышечной системы среди населения РФ увеличилась на 35% и достигла 19 260 000 чел. [3]. Ревматоидный артрит (РА) занимает ведущее место среди воспалительных заболеваний опорно-двигательного аппарата [1]. Согласно клиническим рекомендациям основные средства медикаментозной терапии РА включают нестероидные противовоспалительные препараты, глюкокортикоиды, базисные противовоспалительные препараты [4]. Выбор препаратов при РА зачастую ограничен развитием у пациентов нежелательных реакций на лекарственную терапию, плохой переносимостью и недостаточной эффективностью лекарственных средств [4]. Поэтому разработка новых препаратов и схем комбинированной терапии РА на сегодняшний день является одной из актуальных задач медико-биологических наук. Согласно действующему руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств влияние соединений-кандидатов на хроническое иммунное воспаление изучают на модели адьювантного артрита у крыс, вызванного субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) в заднюю лапу [6]. Эта модель разрабатывалась с середины прошлого столетия [11, 15] и является широко известной и используемой как в России, так и за рубежом по сей день [5, 13, 19]. На этой модели у крыс наблюдаются как внешние признаки артрита (деформация конечностей, их отечность и эритема), так и патоморфологические изменения поражений суставов, характерные для РА в клинике [8]; снижается порог болевой

реакции поврежденной конечности в тесте механического раздражения лапы, однако не наблюдается повышения болевой чувствительности в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения и в тесте механического раздражения хвоста [14]. Характерной особенностью модели является то, что при субплантарном введении ПАФ полиартрит развивается только у крыс, попытки моделирования полиартрита введением ПАФ другим лабораторным животным потерпели неудачу [12]. Однако вторичная иммунологическая реакция (повреждение задней конечности, контралатеральной той, в которую вводят ПАФ) у крыс с адьювантным артритом формируется не у всех особей. Так, в работе Е. В. Шекуновой и соавт. [8] описано развитие генерализации патологического процесса той или иной выраженности примерно у 41% животных с этой моделью: у 25% крыс она затрагивает суставы контралатеральной задней конечности, суставы передних конечностей и суставы хвоста; у 16% крыс она проявляется поражением суставов контралатеральной по отношению к стороне инъекции ПАФ задней лапы. Рядом исследователей субплантарная инъекция ПАФ в заднюю лапу крыс используется как модель артрита, при которой у животных регистрируют отечность только той лапы, в которую вводят ПАФ [2, 7]. Таким образом, на модели воспаления у крыс, вызванного субплантарной инъекцией ПАФ в заднюю лапу, можно регистрировать отек лапы, в которую вводят индуктор воспаления (первичная реакция на ПАФ), и отек контралатеральной лапы (вторичная иммунологическая реакция на ПАФ), имея в виду, что вторичная иммунологическая реакция развивается примерно у половины особей группы.

Цель исследования — сравнить выраженность патологического процесса у животных с первичной реакцией и вторичной иммунологической воспалительной реак-

цией на субплантарную инъекцию ПАФ в заднюю лапу.

Материалы и методы

Исследование выполнено на самцах половозрелых аутбредных белых крыс первоначальной массой 260–300 г. Животных получали из питомника лабораторных животных «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Содержание животных осуществлялось в соответствии с нормативным документом СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Организация и проведение работы выполнялись в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказом Минздрава РФ № 199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Воспалительный процесс у крыс (n=20) моделировали путем субплантарного введения в левую заднюю стопу 0,1 мл ПАФ (взвесь БЦЖ в вазелиновом масле, Sigma-Aldrich, США) [6]. Контрольными животными служили крысы без экспериментальной патологии (n=15). Выраженность воспаления оценивали в динамике по нарастанию симптомов первичной реакции (отек левой задней лапы) и вторичной иммунологической реакции (отек правой задней лапы) на инъекцию ПАФ. Регистрировали увеличение диаметра стоп в плюсневой области и диаметра голеностопных суставов животных на 7, 14, 21 и 28 сут эксперимента по сравнению с фоновыми значениями (до введения ПАФ). Диаметр стоп в плюсневой

области и диаметр голеностопных суставов задних конечностей измеряли с помощью инженерного штангенциркуля. Крыс с воспалением, вызванным субплантарным введением ПАФ, делили на две группы в зависимости от наличия у них вторичной иммунологической реакции на 7 день опыта и проводили сравнительное исследование выраженности патологического процесса в этих группах.

На 7, 14, 21 и 28 сут после введения ПАФ регистрировали температуру кожи задних конечностей крыс. Температуру кожи измеряли инфракрасным электронным термометром (модель DT-633, A&D medical, Япония). Кроме того, в эти же дни опыта регистрировали массу тела крыс и рассчитывали изменение массы тела животных относительно фоновых значений.

Болевую чувствительность крыс с экспериментальной моделью воспаления оценивали на 15 сут в подошвенном тесте [6] на приборе “Hargreaves Apparatus” (Ugo Basile, Италия), регистрируя латентный период отдергивания лап (секунды) после подачи инфракрасного теплового воздействия на подошву животных при интенсивности излучения, равной 66, что соответствует повышению температуры воздействия от 45 до 55°C в течение 10 с.

О нарушении функции суставов крыс с моделью воспаления судили, оценивая координацию движений животных на 21 день эксперимента в тесте «Вращающегося стержня», Rota Rod (Ugo Basile, Италия). Установка представляет собой барабан 3 см в диаметре, разделенный 6 дисками (25 см в диаметре) на 5 одинаковых частей. Барабан может вращаться в разных скоростных режимах, задаваемых в зависимости от задач исследования и тяжести состояния животных. За 15 мин до тестирования животных адаптировали к условиям методики, осуществляя по 3 последовательных посадки на барабан «Вращающегося стержня» со скоростью 5 об./мин. Тести-

рование моторного навыка осуществляли при режиме вращения барабана со скоростью от 10 до 30 об./мин (ускорение составляло 1 об. за 10 с), регистрируя латентное время первого падения и скорость вращения стержня до первого падения.

На 14 и 28 сут после введения ПАФ у животных брали кровь, ампутировав кончик хвоста. Для предотвращения загрязнения и возможной ошибки при измерении первые капли удалялись из пробы. На гематологическом анализаторе «Abacus Junior VET» (Diatron, Австрия) регистрировали следующие гематологические показатели: абсолютное содержание лейкоцитов (WBC); абсолютное содержание лимфоцитов (LYM); абсолютное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов (MID); абсолютное содержание гранулоцитов (GRA); относительное (%) содержание лимфоцитов (LY%); содержание средних клеток на долю лейкоцитов (MI%); относительное (%) содержание гранулоцитов (GR%); абсолютное содержание эритроцитов (RBC); концентрацию гемоглобина в периферической крови (HGB); гематокрит (HCT); средний объем эритроцита (MCV); среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах (MCH); среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC); ширину распределения эритроцитов (RDWc); абсолютное содержание тромбоцитов (PLT); тромбоцит (PCT); средний объем тромбоцитов (MPV); ширину распределения тромбоцитов (PDWc).

Статистическую обработку проводили на языке программирования R версии 3.5.1. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро — Уилка с последующей оценкой межгруппового равенства дисперсий по критерию Бартлетта. В случае, когда не во всех группах было нормальное распределение данных и межгрупповая гомогенность дисперсий отсутствовала, для оценки различий между группами

использовали двухвыборочное сравнение с помощью критерия Манна — Уитни и результаты в таблицах представляли медианой (1 квартиль; 3 квартиль). Для оценки различия между группами по признаку «Изменения массы крыс в динамике» использовали двухвыборочное сравнение по t-критерию Стьюдента, результаты в таблице представляли как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (стандартное отклонение). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Из 20 крыс, которым субплантарно в левую заднюю лапу вводили ПАФ, через 7 дней после его введения вторичная иммунологическая реакция, проявляющаяся повреждением правой задней конечности (конечности, контралатеральной той, в которую осуществляли инъекцию), развивалась у 11 животных (группа «вторичная иммунологическая реакция»), что составило 55% крыс с моделью воспаления. У этих животных признаки воспаления правой задней лапы проявились значимым увеличением как диаметра стопы в плюсневой области, так и диаметра голеностопного сустава задней конечности на протяжении всего эксперимента. У оставшихся 9 животных с экспериментальной патологией (группа «первичная реакция») развилось выраженное повреждение только левой задней лапы: у них не наблюдалось достоверного увеличения диаметра правой задней лапы по параметру «диаметр стопы в плюсневой области» ни в один из дней регистрации. Однако на 14 день наблюдения у этих крыс была зафиксирована отечность голеностопного сустава правой задней лапы, по степени в 2,2 раза уступающая соответствующему параметру в подгруппе крыс с выраженной вторичной иммунологической реакцией. Отек голеностопного сустава правой задней лапы крыс группы «первичная реакция» уменьшался на про-

тяжении последующих двух недель опыта вплоть до практически полного исчезновения к 28 дню эксперимента (табл. 1).

Увеличение диаметра стопы в плюсневой области и диаметра голеностопного сустава крыс с развившейся вторичной иммунологической реакцией было стабильным на протяжении первых двух недель эксперимента: медиана изменения диаметра стопы правой задней конечности в плюсневой области на 7 день опыта составляла 0,9 мм, на 14 день — 1,1 мм; медиана изменения диаметра правого голеностопного сустава на 7 день эксперимента была равна 1,2 мм, на 14 день — 1,1 мм. На протяжении последующих двух недель отечность правой лапы этих крыс снижалась, достигнув по обоим параметрам регистрации значения медианы, составившего 0,4 мм. При этом в течение всего месячного эксперимента диаметр стопы в плюсневой области и голеностопного сустава правой задней лапы крыс с вторичной иммунологической реакцией был достоверно выше, чем в контрольной группе животных и в группе крыс, у которых развилась преимущественно первичная реакция на введение ПАФ (табл. 1). Кроме того, у животных с наблюдающейся генерализацией патологического процесса (группа «вторичная иммунологическая реакция») на 7 день опыта отмечена и достоверно в 2,4 раза более выраженная отечность левого голеностопного сустава по сравнению с группой крыс с моделью воспаления, у которых была повреждена левая задняя лапа (табл. 1). Во все дни регистрации уровня отека лап увеличение диаметра стопы в плюсневой области и голеностопного сустава левой задней лапы в обеих группах животных с экспериментальной патологией разной степени тяжести было значимым по сравнению с соответствующими показателями в контрольной группе. Однако на 14, 21 и 28 дни опыта достоверных различий между группами «первичная реакция»

и «вторичная иммунологическая реакция» зафиксировано не было (табл. 1).

У животных с изучаемой моделью воспаления наблюдались эритема и повышение температуры кожи стоп задних конечностей. На 7 день после введения ПАФ в обеих группах крыс с экспериментальной патологией температура кожи стоп задних лап была достоверно повышена относительно соответствующих показателей контрольной группы. Так, у животных группы «первичная реакция» температура кожи стопы левой задней конечности была на 14,6% выше, чем в контрольной группе; температура кожи стопы правой задней конечности увеличилась на 5,7%. Температура кожи стоп задних конечностей крыс группы «вторичная иммунологическая реакция» повышалась более значительно, чем в группе «первичная реакция», однако значимых отличий между этими группами зафиксировано не было. Температура кожи стопы левой задней конечности у животных с наблюдающейся генерализацией патологического процесса была выше значений контрольной группы на 19,6%, температура кожи стопы правой задней конечности увеличилась на 11,0% (табл. 2).

На 14 день опыта температура кожи лап животных с моделью воспаления практически не отличалась от соответствующих значений в контрольной группе, за исключением температуры кожи стопы левой задней лапы крыс в группе «вторичная иммунологическая реакция», которая оставалась достоверно повышенной. На 21 и 28 дни опыта температура кожи стоп задних лап крыс с экспериментальной патологией значимо не отличалась от температуры кожи стоп задних лап контрольных животных (табл. 2).

На 15 день у крыс с вторичной иммунологической реакцией болевой порог обеих задних лап был значимо снижен по сравнению с контрольными животными. Так, это снижение для левой лапы составило 25%, для правой лапы — 40% по сравне-

Таблица 1. Отечность задних конечностей крыс в динамике
Table 1. Edema of the hind paws in dynamics

Группа	Изменение диаметра стоп и голеностопных суставов задних конечностей крыс (мм) относительно соответствующих фоновых значений после введения полного адьюванта Фрейнда на:			
	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
1.1. Изменение диаметра стопы левой задней конечности в плюсовой области				
Контроль, n=15	0,1 (-0,2; 0,2)	0,1 (-0,5; 0,4)	0 (-0,2; 0,3)	0 (-0,2; 0,4)
Первичная реакция, n=9	2,3 (1,8; 3,7)*	3,3 (3,0; 3,5)*	2,5 (2,0; 3,1)*	2,5 (2,0; 3,0)*
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	2,6 (2,1; 3,0)*	2,5 (2,5; 3,2)*	2 (2,0; 2,8)*	1,9 (1,0; 2,0)*
1.2. Изменение диаметра левого голеностопного сустава				
Контроль	-0,1 (-0,3; 0,4)	-0,2 (-0,3; 0,0)	0,0 (-0,4; 0,3)	0,0 (-0,1; 0,2)
Первичная реакция, n=9	0,5 (0,4; 1,0)*	1,0 (0,5; 1,8)*	0,8 (0,6; 1,3)*	0,4 (0,1; 0,5)*
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	1,2 (1,1; 1,5)**	1,3 (1,1; 1,6)*	0,9 (0,8; 1,1)*	0,4 (0,2; 0,7)*
1.3. Изменение диаметра стопы правой задней конечности в плюсовой области				
Контроль	0,0 (-0,4; 0,5)	0,1 (-0,2; 0,5)	0 (-0,3; 0,2)	0,0 (-0,2; 0,4)
Первичная реакция, n=9	0,0 (-0,1; 0,5)	0,3 (0,2; 0,5)	0,3 (0,1; 0,4)	0,0 (-0,1; 0,2)
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	0,9 (0,7; 1,0)**	1,1 (0,9; 1,3)**	0,8 (0,6; 0,9)**	0,4 (0,2; 0,7)**
1.4. Изменение диаметра правого голеностопного сустава				
Контроль	0,1 (0,0; 0,4)	0 (-0,2; 0,1)	0 (-0,1; 0,05)	0 (-0,2; 0,2)
Первичная реакция, n=9	0,4 (0,0; 0,5)	0,5 (0,5; 0,6)*	0,2 (0,2; 0,4)	0,1 (-0,1; 0,2)
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	1,2 (0,9; 1,4)**	1,1 (1,0; 1,4)**	0,9 (0,6; 1,1)**	0,4 (0,4; 0,6)**

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, # — $p < 0,05$ по сравнению с группой «Первичная реакция».

Note: * — $p < 0.05$ compared to the control group, # — $p < 0.05$ compared to the group “Primary reaction”.

Таблица 2. Температура кожи задних конечностей крыс в динамике
Table 2. Skin temperature of the hind paws of the rats in dynamics

Группа	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
Температура кожи стопы левой задней конечности крыс				
Контроль, n=15	28,10 (26,60; 29,85)	32 (30,65; 33)	29,20 (28,15; 30)	28,70 (27,55; 30,60)
Первичная реакция, n=9	32,20 (29,80; 33,65)*	30,80 (29,65; 32,15)	31,10 (28,95; 31,80)	29,00 (27,85; 30,00)
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	33,60 (31,50; 35,80)*	32,60 (32,10; 33,70)*	29,7 (28,3; 32,4)	29,00 (28,30; 31,70)
Температура кожи стопы правой задней конечности крыс				
Контроль, n=15	28,10 (26,70; 29,70)	32,00 (30,35; 33,10)	29,30 (28,25; 29,95)	28,70 (27,55; 30,35)
Первичная реакция, n=9	29,70 (28,80; 33,10)*	31,40 (28,60; 32,30)	30,40 (28,95; 31,60)	28,40 (27,55; 29,85)
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	31,2 (30,9; 32,5)*	30,30 (29,50; 31,90)	28,30 (28,00; 29,70)	28,50 (27,70; 29,80)

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

Note: * — $p < 0.05$ compared to the control group.

нию с контрольной группой крыс. Однако и в группе животных, у которых была зарегистрирована отечность преимущественно левой задней лапы, болевая чувствительность обеих задних лап была также достоверно повышена по сравнению с группой крыс без экспериментальной патологии: болевой порог левой лапы крыс этой группы был снижен на 17%, правой — на 36% по сравнению с соответствующими показателями контрольных животных (табл. 3).

В тесте «Вращающегося стержня», оценивающего координацию движения животных, на 21 день после введения ПАФ значимых изменений способности крыс с изучаемой моделью воспаления удерживаться на вращающемся барабане по сравнению с контрольной группой зарегистрировано не было. Однако у животных с экспериментальной патологией отмечено снижение медианы латентного периода падения с установки на 20,1–33,4% и, соответственно, средней скорости вращения барабана установки в момент падения крыс на 20,0–30,0% (недостоверно) (табл. 4). Вероятно, нарушение функции

суставов крыс с изучаемой моделью воспаления, приводящее к снижению их координации движения, можно зафиксировать в более ранние сроки после инъекции ПАФ, что требует дальнейшего исследования.

Развитие патологического процесса в обеих группах крыс с моделью воспаления сопровождалось достоверно сниженным приростом массы тела животных по сравнению с контрольной группой на протяжении всего опыта (табл. 5). Наиболее ярко эта разница проявлялась на 7 сут после инъекции ПАФ. Так, у животных с преимущественным отеком левой задней лапы прирост массы тела был в 2,1 раза ниже, а у крыс с наблюдающейся генерализацией патологического процесса — в 5,2 раза ниже, чем в группе крыс без патологии (табл. 5). При регистрации прироста массы тела на 14, 21 и 28 сут эксперимента разница этого параметра в группах животных с моделью воспаления по сравнению с контрольной группой была не столь драматичной и составляла 30,5–41,6% (табл. 5).

У крыс с изучаемой моделью воспаления резких изменений гематологических по-

Таблица 3. Порог болевой чувствительности крыс в подошвенном тесте
Table 3. The pain threshold of rats in a plantar test

Группа	Латентный период для левой лапы, с	Латентный период для правой лапы, с
Контроль, n=15	13,4 (12,35; 14,97)	14,15 (12,78; 15,12)
Первичная реакция, n=9	11,15 (10,15; 12,53)*	9,1 (7,0; 11,95)*
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	10,1 (9,2; 11,75)*	9,1 (7,0; 11,95)*

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

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

Таблица 4. Координация движения животных на 21 сут эксперимента в тесте «Вращающегося стержня» при режиме скорости вращения барабана 10 до 30 об./мин

Table 4. Coordination of animals in a rotarod test under acceleration of the drum from 10 to 30 rpm on the 21th day of the experiment

Группа	Латентный период первого падения, с	Средняя скорость, об./мин
Контроль, n=15	67,0 (41,0; 84,3)	20,0 (14,0; 21,5)
Первичная реакция, n=9	44,6 (23,0; 80,0)	14,0 (10,0; 21,0)
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	53,0 (34,0; 70,0)	16,0 (12,5; 19,0)

Таблица 5. Изменение массы тела крыс в динамике

Table 5. Change in body weight of rats in dynamics

Группа	Изменение массы тела крыс (г) относительно фоновых значений после введения полного адьюванта Фрейнда на:			
	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
Контроль, n=15	28,4±1,6 (6,2)	51,5±3,2 (12,3)	71,8±3,7 (14,4)	87,3±4,4 (17,0)
Первичная реакция, n=9	13,8±1,7 (5,2)*	30,1±3,8 (11,3)*	41,2±3,5 (10,5)*	57,7±2,4 (7,3)*
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	5,5±1,3 (4,2)*	32,4±2,3 (9,8)*	49,9±3,7 (12,3)*	59,3±3,1 (10,2)*

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

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

казателей относительно соответствующих значений контрольной группы зафиксировано не было (табл. 6), что свидетельствует в пользу подобию развивающегося у животных патологического процесса клинической картине РА у людей. Повышение ряда гематологических показателей у крыс с экспериментальной патологией зарегистрировано на 14 сут после введения ПАФ. У животных с преимущественным повреждением левой задней лапы относительно показателей контрольной группы достоверно были повышены: абсолютное содержание гранулоцитов — на 67,6%, абсолютное содержание тромбоцитов — на 20,6% и тромбокрит — на 27,3%. Изменения гематологических показателей у крыс группы «вторичная иммунологическая реакция» были более выраженными и проявлялись увеличени-

ем абсолютного содержания лейкоцитов на 58,5%, абсолютного содержания лимфоцитов — на 59,2%, абсолютного содержания гранулоцитов — на 56,8%, абсолютного содержания тромбоцитов — на 12,4% и тромбокрита — на 9,1% (табл. 6). Однако, несмотря на то, что значения указанных гематологических показателей были достоверно выше соответствующих показателей контрольной группы животных, что можно рассматривать в качестве неспецифической реакции на воспалительный процесс, они не выходили за пределы референсных значений. Известно, что и у пациентов с РА при обострении заболевания регистрируют умеренное увеличение уровня тромбоцитов [10, 16]. На 28 сут в обеих группах животных с изучаемой моделью воспаления наблюдалась нормализация гематологических показателей (табл. 6).

Таблица 6. Гематологические показатели крыс

Table 6. Hematological parameters of the rats

Показатель	Сутки после введения полного адьюванта Фрейнда					
	14			28		
	Контроль	Перв. реакция	Втор. иммун. реакция	Контроль	Перв. реакция	Втор. иммун. реакция
WBC	12,3 (10,7; 16,4)	17,6 (14,0; 18,6)	19,5 (15,9; 21,4)*	16,9 (14,3; 18,9)	15,7 (12,9; 18,4)	17,3 (16,5; 20,3)
LYM	7,1 (5,7; 9,2)	7,6 (5,7; 10,2)	11,3 (8,1; 14,4)*	11,4 (9,1; 12,3)	10,0 (7,7; 12,3)	12,7 (11,2; 13,3)
MID	1,1 (0,5; 1,6)	1,1 (0,2; 1,5)	1,4 (0,9; 1,7)	1,4 (0,1; 2,1)	1,6 (0,1; 2,1)	1,3 (0,1; 1,7)
GRA	3,7 (3,2; 4,6)	6,2 (4,8; 10,3)*	5,8 (5,1; 6,6)*	4,3 (3,8; 5,2)	4,1 (3,1; 4,9)	4,1 (3,7; 5,5)

Продолжение таблицы 6

Показатель	Сутки после введения полного адьюванта Фрейнда					
	14			28		
	Контроль	Перв. реакция	Втор. иммун. реакция	Контроль	Перв. реакция	Втор. иммун. реакция
LY%	62,5 (54,5; 65,4)	49,5 (36,9; 72,7)	57,6 (51,4; 67,2)	66,4 (58,4; 69,3)	68,6 (56,9; 72,4)	65,6 (61,6; 69,5)
MI%	10,5 (3,0; 12,4)	7,4 (0,6; 9,2)	8,9 (6,0; 10,4)	10,2 (0,6; 12,4)	9,8 (0,6; 12,2)	7,3 (0,7; 11,0)
GR%	28,5 (27,3; 36,6)	41,3 (26,7; 49,8)	32,2 (24,8; 38,5)	29,8 (22,7; 32)	27,1 (24,2; 30,4)	25,2 (22,1; 29,7)
RBC	8,0 (7,7; 8,7)	8,3 (7,7; 8,5)	8,7 (8,3; 9,1)	9,1 (8,2; 9,3)	8,8 (8,1; 9,4)	9,4 (8,8; 10,0)
HGB	134,0 (123,0; 140,0)	131,0 (128,0; 133,0)	137,5 (134,8; 139,8)	137,0 (133,0; 141,5)	138,0 (130,0; 144,0)	138,0 (134; 143,5)
HCT	43,0 (41,7; 47,1)	43,4 (42,1; 44,2)	44,3 (43,9; 46,6)	45,5 (40,9; 47,5)	44,3 (43,6; 47,7)	47,4 (46,3; 49,6)
MCV	54,0 (53,0; 55,0)	53,0 (51,0; 55,0)	53,0 (51,5; 55,5)	51 (48,5; 53,0)	51,0 (49,0; 53,0)	51,0 (48,8; 54,0)
MCH	15,9 (15,6; 16,4)	15,8 (15,6; 16,8)	15,85 (15,7; 17,1)	15,2 (14,9; 16,7)	16,0 (15,2; 16,0)	15,6 (15,0; 16,5)
MCHC	297,0 (291,0; 301,5)	301,0 (296,0; 309,0)	301,5 (299,5; 304,0)	307 (296,5; 315,5)	304,0 (301,0; 314,0)	304,0 (302,0; 311,5)
RDWc	16,4 (16,0; 16,7)	17,1 (16,7; 17,4)	15,9 (15,5; 17,0)	15,7 (15,7; 16,8)	16,5 (16,0; 16,9)	16,4 (15,9; 17,1)
PLT	428,0 (389,5; 464,0)	516,0 (507,0; 541,0)*	481,0 (457,8; 552,8)*	434,0 (399; 451)	463,0 (380,0; 477,0)	412,0 (387,5; 441,2)
PCT	0,22 (0,20; 0,25)	0,28 (0,26; 0,29)*	0,24 (0,24; 0,28)*	0,23 (0,20; 0,24)	0,24 (0,19; 0,27)	0,21 (0,20; 0,22)
MPV	5,1 (5,1; 5,2)	5,1 (5,0; 5,2)	5,1 (4,9; 5,2)	5,2 (5,0; 5,3)	5,3 (5,1; 5,4)	5,0 (4,8; 5,3)
PDWc	31,9 (31,0; 32,6)	32,7 (31,4; 33,0)	31,4 (30,3; 31,8)	31,7 (31,4; 32,3)	32,2 (31,7; 32,3)	31,8 (31,2; 32,2)

Примечание: «Перв. реакция» — группа «первичная реакция»; «Втор. иммун. реакция» — группа «вторичная иммунологическая реакция»; WBC — абсолютное содержание лейкоцитов; LYM — абсолютное содержание лимфоцитов; MID — абсолютное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов; GRA — абсолютное содержание гранулоцитов; LY% — относительное (%) содержание лимфоцитов; MI% — содержание средних клеток на долю лейкоцитов; GR% — относительное (%) содержание гранулоцитов; RBC — абсолютное содержание эритроцитов; HGB — концентрация гемоглобина в периферической крови; HCT — гематокрит; MCV — средний объем эритроцита; MCH — среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах; MCHC — средняя концентрация гемоглобина в эритроците; RDWc — ширина распределения эритроцитов; PLT — абсолютное содержание тромбоцитов; PCT — тромбокрит; MPV — средний объем тромбоцитов; PDWc — ширина распределения тромбоцитов; * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Note: “Перв. реакция” — primary reaction group; “Втор. иммун. реакция” — secondary immunological reaction group; WBC — absolute leukocyte count; LYM — absolute lymphocyte count; MID — absolute count of the mixture of monocytes, basophils and eosinophils; GRA — absolute granulocyte count; LY% — relative (%) lymphocyte count; MI% — count of “medium” cells per leukocytes; GR% — relative (%) granulocyte count; RBC — absolute erythrocyte count; HGB — peripheral blood haemoglobin concentration; HCT — hematocrit; MCV — average volume of erythrocytes; MCH — average amount of haemoglobin in an erythrocyte, in absolute units; MCHC — average concentration of haemoglobin in an erythrocyte; RDWc — red blood cell distribution width; PLT — absolute platelet count; PCT — thrombokrit; MPV — mean platelet volume; PDWc — platelet distribution width; * — $p < 0.05$ compared with the control group.

Заключение

Таким образом, в проведенном сравнительном исследовании воспалительного процесса у крыс с первичной реакцией и вторичной иммунологической реакцией на субплантарную инъекцию ПАФ в заднюю лапу животных установлено, что максимальная отечность задних конечностей наблюдается на 14 сут опыта как в группе животных с генерализацией патологического процесса (с отеком левой и правой задних конечностей), так и у крыс с развивающимся повреждением преимущественно задней лапы, в которую вводили ПАФ (с отеком левой задней конечности). При этом отечность голеностопного сустава задней лапы, в которую была сделана инъекция индуктора воспаления, была достоверно более выражена в группе крыс с вторичной иммунологической реакцией по сравнению с группой животных с первичной реакцией на 7 сут после введения ПАФ. На 14 сут после инъекции ПАФ у животных зафиксировано повышение ряда гематологических показателей, более выраженное в группе животных с вторичной иммунологической реакцией. Кроме того, у крыс с изучаемой экспериментальной моделью зарегистрированы такие типичные признаки воспаления, как эритема

и гипертермия области воспаления (на 7 сут в обеих группах). На фоне развившейся патологии в обеих группах крыс с моделью воспаления снизился болевой порог, который регистрировали по латентному периоду отдергивания задних лап в ответ на тепловое воздействие в подошвенном тесте на 15 сут опыта. На протяжении всего эксперимента прирост массы тела крыс с воспалительным процессом был достоверно ниже, чем у животных без патологии. К 28 сут опыта отечность лап животных с изучаемой экспериментальной моделью как в группе крыс с генерализацией патологического процесса, так и у крыс с развивающимся повреждением преимущественно задней лапы, в которую вводили ПАФ, значительно снижалась по сравнению с 14 сут, температура кожи задних конечностей и гематологические показатели не отличались от соответствующих параметров в группе контрольных животных. Выявленные особенности развития воспалительного процесса, вызванного субплантарной инъекцией ПАФ в заднюю лапу крыс, могут иметь существенное значение при планировании опытов по оценке фармакологической активности соединений на данной модели и интерпретации результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Балабанова Р.М., Дубинина Т.В., Эрдес Ш.Ф. Динамика заболеваемости ревматическими заболеваниями взрослого населения России за 2010–2014 гг. *Научно-практическая ревматология*. 2016;3(54):266–270. [Balabanova R.M., Dubinina T.V., Ehrdes Sh.F. Dinamika zaboлеваemosti revmaticheskimi zaboлеванiyami v zroslogo naseleeniya Rossii za 2010–2014 gg. [The dynamics of the incidence of rheumatic diseases in the adult population of Russia in 2010–2014]. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya* [Scientific and practical rheumatology]. 2016;3(54):266–270. (In Russian)].
2. Веснина Л.Э., Мамонтова Т.В., Микитюк М.В., Боброва Н.А., Куценко Л.А., Ярошенко Г.А., Кайдашев И.П. Фуллерен С 60 обладает иммуномодулирующей активностью при адьювантном артрите у крыс. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012;75(8):15–20. [Vesnina L.E., Mamontova T.V., Mikityuk M.V., Bobrova N.A., Kucenko L.A., Yaroshenko G.A., Kajdashev I.P. Fulleren C 60 oblaдаet immunomoduliruyushchey aktivnostyu pri adyuvantnom artrite u kryс [Fullerene C 60 has immunomodulatory activity in adjuvant arthritis in rats]. *Experimental and clinical pharmacology*. 2012;75(8):15–20. (In Russian)].
3. Заболеваемость всего населения России в 2017 году. *Статистические данные Министерства здравоохранения РФ*. М., 2018. [Zaboлеваemost vsego naseleeniya Rossii v 2017 godu. *Statisticheskie dannye Ministerstva zdравooхранeniya RF* [The incidence of the entire population of Russia in 2017. *Statistics from the Ministry of Health of Russian Federation*]. Moscow, 2018. (In Russian)].
4. Клинические рекомендации. Ревматоидный артрит. Министерство здравоохранения РФ. М., 2018. [Klinicheskie rekomendatsii. Revmatoidniy artrит. [Clinical guidelines. Rheumatoid arthritis]. *Ministerstvo zdравooхранeniya RF* [Ministry of Health of the Russian Federation]. Moscow, 2018. (In Russian)].
5. Коваленко Л.П., Мирamedова М.Г., Алексеева С.В., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Серединин С.Б. Противовоспалительные свойства ноопепта (дипептидного ноотропа ГВС-111). *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;65(2):53–55. [Kovalenko L.P., Miramedova M.G., Alekseeva S.V., Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Seredinin S.B. Protivovospalitelnye svoystva noopepta (dipeptidnogo nootropа GVS-111) [Anti-inflammatory properties of noopept (dipeptide nootropic drug GVS-111)]. *Experimental and clinical pharmacology*. 2002;65(2):53–55. (In Russian)].
6. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1* / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [*Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Ch. 1* / Guide to conducting pre-clinical studies of drugs. Pt 1]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Griff i K Publ., 2012. 944 p. (In Russian)].
7. Ульянина Л.Р., Залыютдинова Л.Н., Гайнетдинова А.Н. Сравнительная оценка эффективности экспериментальной терапии адьювантного артрита у крыс новым аминокислотным комплексом лития и метотрексатом. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;(4):469. [Ulyanina L.R., Zalyalyutdinova L.N., Gainetdinova A.N. Sravnitel'naya otsenka effektivnosti eksperimentalnoy terapii adyuvantnogo artrita u kryс novym aminokislotnym kompleksom litiya i metotreksatom [Comparative evaluation of the effectiveness of experimental therapy for adjuvant arthritis in rats with a new amino acid complex of lithium and methotrexate]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Actual problems of science and education]. 2015;(4):469. (In Russian)].
8. Шекунова Е.В., Кашкин В.А., Мужикян А.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Сравнительный анализ двух экспериментальных моделей хронического артрита у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2016;79(10):22–28. [Shekunova E.V., Kashkin V.A., Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Makarov V.G. Sravnitel'nyy analiz dvuh eksperimentalnykh modeley khronicheskogo artrita u kryс [Comparative analysis of two experimental models of chronic arthritis in rats]. *Experimental and clinical pharmacology*. 2016;79(10):22–28. (In Russian)].
9. Jiang J., Wu F., Lu J., Lu F., Xu Q. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract from *Rhizoma smilacis glabrae*. *Pharmacological Research*. 1997;36(4):309–314.
10. Kacena M.A., Horowitz M.C. The role of megakaryocytes in skeletal homeostasis and rheumatoid arthritis. *Cur. Opin. Rheumatol.* 2006;18(4):405–410.
11. Newbould B.B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. *Br. J. of Pharmacology and Chemotherapy*. 1963;21:127–136.
12. Pearson C.M. Experimental joint disease observations on adjuvant-induced arthritis. *J. of Chronic Diseases*. 1963;16:863–874.
13. Patel H., Dawson B., Humby F., Blades M., Pitzalis C., Burnet M., Seed M. Animal Models of Rheumatoid Arthritis. In: Serhan C., Ward P., Gilroy D. (eds) *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. Pp. 385–412.
14. Stein C., Millan M.J., Herz A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 1988;31(2):445–451.
15. Zahiri H., Gagnon J., Ayotte R., Laurin C.A. Adjuvant experimental polyarthritis. *Canadian Medical Association J.* 1969;101(5):269–278.
16. <https://medi.ru/info/1912>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Матюшкин Александр Иванович*, ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт фармако-
логии им. В.В. Закусова»;
e-mail: matyushkin.alex@gmail.com

Alexander I. Matyushkin*, Research Zakusov
Institute of Pharmacology;
e-mail: matyushkin.alex@gmail.com

Иванова Елена Анатольевна, к.фарм.н.,
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии им. В.В. Закусова»;
e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Elena A. Ivanova, Cand. Sci. (Pharm.), Research
Zakusov Institute of Pharmacology;
e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Алексеева Светлана Витальевна, ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт фармако-
логии им. В.В. Закусова»;
e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

Svetlana V. Alekseeva, Research Zakusov Institute
of Pharmacology;
e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

Кирилл Сергеевич Качалов, ФГБНУ «Науч-
но-исследовательский институт фармакологии
им. В.В. Закусова»;
e-mail: kkachalov@mail.ru

Kirill S. Kachalov, Research Zakusov Institute of
Pharmacology;
e-mail: kkachalov@mail.ru

Воронина Татьяна Александровна, д.м.н.,
проф., ФГБНУ «Научно-исследовательский
институт фармакологии им. В.В. Закусова»;
e-mail: voroninata38@gmail.com

Tatyana A. Voronina, Dr. Sci. (Med.), Prof., Re-
search Zakusov Institute of Pharmacology;
e-mail: voroninata38@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

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

Приоритетные области и задачи научных исследований:

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

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

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

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

Во исполнение вышеуказанного решения ВАК при Минобрнауки России учредитель

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

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

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

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

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

Полная информация по журналу представлена на сайте <http://www.scbmt.ru> (раздел «Журнал “Биомедицина”»).

Лабораторкорм

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

Реализуем:

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



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

Доставка в любой регион России

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

ООО «Лабораторкорм»

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

www.laboratorkorm.ru

21–22 мая 2019 года в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России проходила XV ежегодная научно-практическая межрегиональная конференция с международным участием «Биомедицина и биомоделирование». В этом году расширилась география проведения конференции. В Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России было проведено пленарное и заключительное заседания (председатель: научный руководитель НЦБМТ ФМБА России чл.-корр. РАН Н.Н. Каркищенко), симпозиумы «Биомоделирование и лабораторные животные» (председатели: чл.-корр. РАН, д.м.н., проф. Н.Н. Каркищенко, к.м.н., доц. М.Т. Гасанов) и «Новые биомедицинские технологии» (председатели: д.м.н., проф. В.Н. Каркищенко, д.м.н., проф. Е.Б. Шустов), «круглый стол» «Перспективы развития лабораторного животноводства» (модераторы: М.Т. Гасанов, К.В. Афонин, И.Д. Чумерин, А.Ю. Кожевников, Е.Л. Матвеевко).

Традиционно симпозиум «Прикладные биомедицинские исследования в токсикологии, фармакологии и фармации» проходил в Санкт-Петербурге на кафедре фармакологии «Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения РФ» (председатели: д.м.н., проф. С.В. Оковитый, д.м.н., проф. Е.Б. Шустов).

В Москве в конференц-зале Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) был организован «круглый стол» «Актуальные вопросы клинической фармакологии» (председатели: д.м.н., проф. Е.В. Ших, д.фарм.н., проф. Г.В. Раменская).

Новой площадкой межрегиональной конференции стала кафедра фармакологии и клинической фармакологии Ростовского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения РФ (Ростов-на-Дону). Там был организован симпозиум «Актуальные вопросы клинической и фундаментальной фармакологии» (председатель: д.м.н., проф. Ю.С. Макляков).

Всего было заслушано 48 докладов. Докладчики приехали из Саратова, Санкт-Петербурга, Ростова-на-Дону, Москвы, Московской области, Самары.

Особый интерес вызвали доклады «Подготовка современных кадров в области разработки лекарственных средств: как части реализации стратегии Фарма-2030» (Г.В. Раменская, ФГОАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Россия, Москва), «Аневризма аорты: экспериментальные модели и новые аспекты фармакотерапии» (Е. Kashina, Университет Шарите, ФРГ, Берлин) и «Изучение антимутагенного и антицитотоксического действия биорага при индукции мутации пестицидами» (А.Г. Пирцхелани, Р.А. Гахокидзе, Н.А. Пирцхелани, Н.В. Мамаладзе, Тбилисский государственный университет им. И. Джавахишвили, Тбилисский государственный медицинский университет, Грузия, Тбилиси).

В дискуссиях и обсуждении приняли участие более 300 человек, включая студентов, аспирантов, ассистентов, клинических ординаторов первого и второго года обучения.

