

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2074-5982 (print)

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 15

2019

4



Уважаемые коллеги!
Сердечно поздравляем всех с Новым годом и Рождеством!



Подводя итоги уходящего года, хотим отметить некоторые моменты. В прошедшем году мы поменяли формат журнала. Надеюсь, что он вам понравился. Мы включили полную информацию об авторах, всем статьям присваиваем doi, что упрощает их поиск в электронных библиотеках, упростили цитирование использованных при написании статьи литературных источников, создали отдельный сайт журнала.

В этих изменениях и переменах нам помогают сотрудники НЭИКОН. И мы благодарны им за это.

Большую помощь в рецензировании присланных статей оказывают члены редакционного совета. Большое спасибо за грандиозную работу, проделанную ими при изучении материалов, высказанные замечания и пожелания по улучшению качества публикуемых статей.

Большое спасибо авторам, присылающим свои работы и активно сотрудничающим с рецензентами и редакционной коллегией журнала.

В будущем году мы планируем, не останавливаясь на достигнутом, продолжать начатое. Мы не будем менять своей позиции по оплате публикаций. Публикации статей остаются бесплатными для всех, все авторы будут безвозмездно получать экземпляр журнала со своей статьёй. Однако реалии нашего времени таковы, что предпочтения при приёме статей будут иметь подписчики журнала. Подписной индекс в общероссийском каталоге «Роспечать. Издания органов НТИ» — 57995.

Мы надеемся на дальнейшее плодотворное сотрудничество с авторами работ, членами редакционного совета, сотрудниками НЭИКОН, всеми, кто делает наш журнал лучше и качественнее.

Мы приглашаем всех на нашу ежегодную научно-практическую конференцию «Биомедицина и биомоделирование», которая традиционно планируется на конец мая 2020 года.

***Желаем всем крепкого здоровья, новых ярких статей,
удачи и успехов в научной работе.***

Главный редактор, академик Н.Н. Каркищенко

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

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2019, Том 15, № 4

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. 4

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

Алимкина Оксана Владимировна, научный сотрудник лаборатории нейротехнологий, 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 реабилита-

ции, 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 ФНKC 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, Краснoгорский 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)

Зефирoв 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 Пушкинского научного центра РАН, заместитель директора, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН», председатель, «Пушкинский научный центр РАН» (Москва, Россия)

Мурашëв 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 РАЕН, профессор кафедры зоотехнии ФГБОУ ВО «Смоленская государственная сельскохозяйственная академия» (Смоленск, Россия)

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

онального 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 РАЕН, 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 of Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia). 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 of 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 of Biomedical Technology of the Federal Medical and Biological Agency (Svetlye Gory, Krasnogorsk District, Moscow Region, Russia)

■ Executive Secretary

Oksana V. Alimkina, Researcher of the Laboratory of Neurotechnologies, Scientific Center of 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 of 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, Svetlye gory village, building 1
Publisher:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Svetlye gory village, building 1
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Svetlye gory village, 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

Е.М. Колоскова, В.Н. Каркищенко, В.А. Езерский, Н.В. Петрова, С.В. Максименко, Е.Л. Матвеевко

Трансгенные и нокаутные кролики в биомедицине и генотерапии.
CRISPR/Cas9-технологии (обзор) 12

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

Липосомированная форма экстракта препуциальной железы кабарги —
новое средство адаптогенного действия 34

■ НОВЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ

Д.А. Абаимов, А.Н. Осинцев, А.В. Шарабанов, М.С. Дуля, Р.А. Агельдинов, В.Н. Каркищенко

Влияние комбинации пептидных экстрактов эндокринных желёз северного оленя
(*Rangifer tarandus*) на процессы катехоламинэргической регуляции
эстральной функции крыс 46

Т.Ю. Оберган, М.Г. Ляпина, М.Е. Григорьева, Л.А. Ляпина

Особенности фармакодинамики глипролиновых пептидов по параметрам
жирового обмена и тромбоэластограммы на фоне развития
метаболического синдрома у крыс 58

■ МЕТОДЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

О.И. Кит, А.Ю. Максимов, Т.П. Протасова, А.С. Гончарова, Д.С. Кутилин, Е.А. Лукбанова

Гуманизированные мыши: методы получения, модели и использование
в экспериментальной онкологии (обзор) 67

С.В. Оковитый, Н.В. Петрова, Е.Б. Шустов, М.А. Белых, Н.В. Кириллова, О.М. Спасенкова, А.Г. Иванов, А.В. Караваева, Д.Ю. Ивкин, Ю.В. Фокин, Е.Л. Матвеевко, О.В. Алимкина

Методология совместного анализа одновременно протекающих патологических
процессов у лабораторных животных 82

А.А. Мокрушин

Криосохранение срезов мозга крыс с различной длительностью
и восстановление их электрической активности 98

Ю.И. Сысоев, К.А. Крошкина, В.А. Пьянкова, В.Е. Карев, С.В. Оковитый

Изменение амплитудных и спектральных параметров электрокортикограмм крыс,
перенесших черепно-мозговую травму 107

■ NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

- Elena M. Koloskova, Vladislav N. Karkischenko, Vadim A. Yezersky, Nataliya V. Petrova, Sergey V. Maksimenko, Elena L. Matveyenko**
Rabbit Biomodels of Human Diseases Developed Using New Genomic Technologies.
CRISPR/Cas9 (Review) 12

- Vladislav N. Karkischenko, Maxim S. Dulya, Ruslan A. Ageldinov, Stanislav L. Lyublinskiy, Nikolay N. Karkischenko**
A Liposomal Composition of Musc Deer Preputial Gland Extract as a New Agent
of Adaptogenic Action 34

■ NEW REGULATORY PEPTIDES

- Denis A. Abaimov, Alexey N. Osintsev, Andrey V. Sharabanov, Maxim S. Dulya, Ruslan A. Ageldinov, Vladislav N. Karkischenko**
Effects of a Combination of Peptide Extracts from Reindeer Endocrine Glands
(*Rangifer Tarandus*) on the Catholaminergic Regulation of the Estral Function in Rats 46

- Tamara Yu. Obergan, Margarita G. Lyapina, Marina E. Grigorjeva, Ludmila A. Lyapina**
Glyproline Peptide Pharmacodynamics in Rats in the Setting of Metabolic Syndrome
by the Parameters of Lipid Metabolism and Tromboelastogramma 58

■ BIOMEDICAL METHODS

- Oleg I. Kit, Alexey Yu. Maksimov, Tatyana P. Protasova, Anna S. Goncharova, Denis S. Kutilin, Ekaterina A. Lukbanova**
Humanized Mice: Creation, Models and Use in Experimental Oncology (Review) 67

- Sergey V. Okovitiy, Nataliya V. Petrova, Evgeniy B. Shustov, Mariya A. Belykh, Nadezhda V. Kirillova, Ol'ga M. Spasenkova, Aleksey G. Ivanov, Anna V. Karavaeva, Dmitriy Yu. Ivkin, Yuriy V. Fokin, Elena L. Matveyenko, Oksana V. Alimkina**
Methodology of Joint Analysis of Concurrent Pathological Processes
in Laboratory Animals 82

- Anatoliy A. Mokrushin**
Cryopreservation of Rat Brain Slices with Different Duration and Restoration
of Their Electrical Activity 98

- Yuriy I. Sysoev, Kseniya A. Kroshkina, Valentina A. P'yankova, Vadim E. Karev, Sergey V. Okovitiy**
Amplitude and Spectral Analysis of Electrocorrctograms in Rats
with Traumatic Brain Injury 107



ТРАНГЕННЫЕ И НОКАУТНЫЕ КРОЛИКИ В БИМЕДИЦИНЕ И ГЕНОТЕРАПИИ. CRISPR/CAS9-ТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР)

Е.М. Колоскова¹, В.Н. Каркищенко², В.А. Езерский¹, Н.В. Петрова^{2*}, С.В. Максименко²,
Е.Л. Матвеевко²

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, пос. Институт*

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

С появлением эндонуклеазных методов редактирования генома, особенно CRISPR/Cas9, стало возможным методом микроинъекции зигот с высокой эффективностью получать животных — как мышей, так и особенно генно-модифицированных кроликов — для различных целей. В настоящей работе рассматриваются современные мировые достижения по созданию кроликов — биомоделей заболеваний человека с использованием технологий геномного редактирования, явления мозаицизма. Делается заключение о целесообразности получения генетически модифицированных кроликов для биомедицинских исследований и биомоделирования.

Ключевые слова: редактирование генома кроликов, трансгеноз, нокаут, CRISPR/Cas9-технологии, мозаицизм, биомодели для генной терапии и биомедицины

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Колоскова Е.М., Каркищенко В.Н., Езерский В.А., Петрова Н.В., Максименко С.В., Матвеевко Е.Л. Трансгенные и нокаутные кролики в биомедицине и генотерапии. CRISPR/Cas9-технологии (обзор). *Биомедицина*. 2019;15(4):12–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-12-33>

Поступила 08.06.2019

Принята после доработки 29.10.2019

Опубликована 10.12.2019

RABBIT BIOMODELS OF HUMAN DISEASES DEVELOPED USING NEW GENOMIC TECHNOLOGIES. CRISPR/CAS9 (REVIEW)

Elena M. Koloskova¹, Vladislav N. Karkischenko², Vadim A. Yezersky¹,
Nataliya V. Petrova^{2*}, Sergey V. Maksimenko², Elena L. Matveyenko²

¹ *All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after academician L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga region, Borovsk, Institut village*

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

With the advent of endonuclease methods of genome editing, particularly CRISPR/Cas9, it has become possible to obtain genetically modified rabbits by microinjection of zygotes. These highly effective human disease models can be used for various purposes. The present review aims to consider modern achievements in the creation of rabbit biomodels of human diseases using the technologies of genetic editing. It is concluded that Russian laboratories should intensify research in the development of genetically modified rabbits that can be used for various biomedical studies and biomodelling.

Keywords: rabbit genome editing, transgenesis, knockout, CRISPR/Cas9 technologies, mosaicism, bio-models for gene therapy and biomedicine

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

For citation: Koloskova E.M., Karkischenko V.N., Yezersky V.A., Petrova N.V., Maksimenko S.V., Matveenko E.L. Rabbit Biomodels of Human Diseases Developed Using New Genomic Technologies. CRISPR/Cas9 (Review). *Journal Biomed.* 2019;15(4):12–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-12-33>

Submitted 08.06.2019

Revised 29.10.2019

Published 10.12.2019

Введение

Генетически модифицированные (ГМ) животные используются в биомедицине для изучения молекулярных основ болезней человека, моделирования заболеваний, в разработке и испытании биопродуктов, для получения рекомбинантных биотехнологических, или т. н. «фармацевтических», белков. Особо востребованы для фармако-токсикологических исследований гуманизированные модели — трансгенные животные, содержащие функционирующие гены, клетки, ткани или иные органоиды человеческого организма [4]. Так, с целью использования в доклинических испытаниях лекарственных препаратов российскими учеными были созданы генно-модифицированные мыши с введенными человеческими генами NAT1, NAT2, HLA I класса и др. [2, 3].

В подавляющем большинстве исследований в качестве биомодели используют мышь, но ее полезность ограничена небольшим размером, короткой продолжительностью жизни, различиями с человеком в анатомии, физиологии, биохимии. В отличие от модели-мыши кролик имеет ряд преимуществ более крупного животного и давно используется для изучения заболеваний человека. Кролики быстро достигают половой зрелости, имеют короткий период беременности,

дают большое потомство при относительно простом содержании. В течение последних двух десятилетий кролики, в т. ч. и трансгенные, все больше востребованы в области биомедицины [6, 11].

Недалекая история трансгеноза и геномного редактирования кроликов

Первый трансгенный кролик был получен микроинъекцией (МИ) конструкции ДНК в пронуклеус зиготы еще в 1985 г. [29], однако эффективность получения трансгенных (ТГ) животных классическим трансгенозом длительное время оставалась низкой [12, 33]. В отличие от мышей технологии использования эмбриональных стволовых клеток (ESC) на кроликах практически не работали, метод переноса ядер соматических клеток (SCNT) имел очень низкую эффективность [16, 30, 99]. В 2011 году с использованием ZNF был получен первый ГМ кролик с сайт-специфичной модификацией — разрушением локуса гена *IgM* [24]. Эта технология была применена в создании кроликов с нокаутом генов *APOC3* и *APOE* [35, 93], *CETP* [101] в 2017 году. Примерно в это же время TALEN-технологией были созданы КО-кролики *Rag1*, *Rag2* [71, 86], *FAH* [43].

Первый кролик с нокаутом гена (knock-out, КО) был получен методом SCNT только

в 2015 году [94]. Тем временем стремительно развивающиеся методы редактирования генома позволили получать КО-гены у разных видов животных, в т. ч. и кроликов [12, 32].

С появлением методов геномного редактирования и новых эндонуклеазных технологий более 10-ти видов млекопитающих, в т. ч. кролик, были добавлены в список животных с нокаутом генов (рис. 1). Эффективность получения ГМ животных методом микроинъекции в пронуклеус возросла в несколько раз. Так, при извлечении из суперовулированной крольчихи 30–50 ооцитов/эмбрионов при их МИ компонентами той или иной эндонуклеазной системы развивается до 50% эмбрионов. После их переноса в фаллопиевы трубы крольчихи-реципиентки 30–50% дают потомство, эффективность ГМ которого может достигать 100%.

По сравнению с классическим трансгенозом современные технологии дают возмож-

ность получения животных с расширенным диапазоном модификаций (нокаутом одного или нескольких целевых генов одновременно, сайт-специфической вставки (knock-in, KI) конкретной геномной последовательности) в применении к оплодотворенным яйцеклеткам методом МИ с очень высокой эффективностью.

Основными механизмами репарации разрывов, вносимых сайт-направленными нуклеазами в определенное место генома, являются негомологичная сшивка концов ДНК (NHEJ) и, в случае наличия подходящей одно- или двухцепочечной матрицы, — гомологичная рекомбинация (HDR), позволяющая сайт-специфично интегрировать трансген, находящийся между плечами гомологии к ДНК-мишени. Направленное редактирование генома позволяет избежать основных недостатков «классического» трансгеноза — случайного встраивания трансгена в геном, неконтролируемого числа копий трансгена.

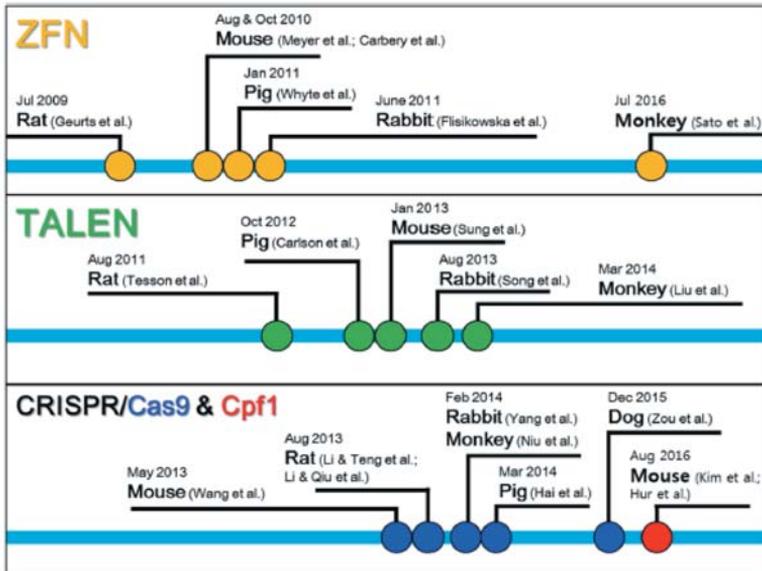


Рис. 1. Хронология применения нуклеазных технологий ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 и Cpf1 для редактирования генома у различных лабораторных животных [41].

Fig. 1. Chronology of application of nuclease technologies ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 and Cpf1 for genome editing in various laboratory animals [41].

Гены-мишени кроликов-биомоделей, полученные с использованием современных эндонуклеазных технологий

Несмотря на впечатляющие результаты, применение методов ZFN и TALEN в практике большинства лабораторий затруднительно. Для редактирования геномов более востребованной оказалась технология **РНК-направляемых эндонуклеаз** — CRISPR/Cas9. Начиная с 2013 года, CRISPR-технология активно применяется для получения ГМ животных с целью их использования в качестве биомоделей для изучения физиологии и болезней человека или животных, биореакторов для получения биологически активных белков, доноров органов для трансплантации [44, 57, 78].

Для идентификации подходящих мишеней РНК-направляющих (sgRNA) эндонуклеаз создано множество онлайн-инструментов [7], позволяющих оценить не только эффективность gRNA, но и их потенциальное неспецифическое действие на геном выбранного организма. Векторы для технологии CRISPR, в т. ч. экспрессионные плазмиды с кодон-оптимизированной версией эндонуклеазы Cas9 (hCas9), можно приобрести в разных компаниях, наиболее популярная из них — Addgene (<http://www.addgene.org>). Существует несколько методов построения векторов экспрессии sgRNA, но все они заключаются в синтезе пары олигонуклеотидов на основе последовательности целевого сайта, которые затем отжигаются и клонируются в CRISPR-вектор.

Кролики, полученные с использованием технологии CRISPR/Cas9

Кролики с нокаутом одного или одновременно нескольких генов. Первые ГМ КО-кролики с использованием технологии РНК-направляемых эндонуклеаз были получены международной группой исследователей (США, Китай, Япония) в 2014 году.

В условиях *in vitro* культивирования кроличьих эмбрионов был осуществлен нокаут девяти генов: *APOE*, *CD36*, *LDLR*, *RyR2*, *CFTR* (трансмембранный регулятор мукосцидоза), *APOC3*, *SCARB1* (белок липидного метаболизма — scavenger receptor class B member1), *LEP* (лептин) и *LEPR* (рецептор лептина). Эффективность sgRNA к целевым генам была разной: от 10% к *LEPR* до 100% к *RyR2*. Были получены F0 кролики нескольких нокаутных линий — *CD36*, *LDLR*, *APOE* и *RyR2* со средней эффективностью нокаута генов 56%, получения биаллельных мутаций — 40%. При использовании всего 10-ти кроликов — доноров эмбрионов и 10-ти реципиентов из 301-го эмбриона получили 38 КО F0 (табл. 2). В среднем на один ген было использовано пять кроликов, работа была выполнена всего за два месяца [92]. В том же году на эмбрионах кроликов была показана возможность одновременного нокаута нескольких генов: эффективность биаллельного КО каждого из генов *IL2rg*, *RAG1* и *RAG2* была 100, 90 и 100% соответственно, т. е. для трех генов сразу — почти 100%. Для 5-ти генов одновременно (*IL2rg*, *RAG1*, *RAG2*, *TIK11*, *ALB*) эффективность биаллельного КО была у каждой третьей бластоцисты. В этой же серии экспериментов с очень высокой эффективностью были получены кролики КО по одному (*IL2rg*^{-/-}) и двум генам одновременно (*IL2rg*^{-/-} + *RAG1*^{-/-}) (табл. 2 и 3) [90].

Кролики со встроенными модификациями (Knock-in, KI)

Локус *ROSA26* очень часто используется для направленного трансгенеза гомологичной рекомбинацией при создании трансгенных организмов с предсказуемым профилем экспрессии трансгена. Встраивание трансгена в этот локус не вызывает неблагоприятных последствий для жизнеспособности и позволяет получить устойчивую экспрессию трансгена во всем организме.

Таблица 1. Гены-мишени для нокаута у кроликов-моделей
Table 1. Target genes for knockout in rabbit models

Ген	Белок, функция	Модель-заболевание, цель исследования	Ссылка
IgM	Иммуноглобулин М	Инактивация эндогена для замены человеческим	[24] ^z
ApoE	Аполипопротеин Е	Метаболизм липидов и липопротеинов: гиперлипидемия, атеросклероз	[93, 35] ^z ; [92, 51, 98]
LDLR	Рецептор липопротеинов низкой плотности		
APOC3	Аполипопротеин С-III		
RyR2	Рианодинновый рецептор 2, компонент кальциевого канала	Сердечная недостаточность	[92]
CD36	Мембранный белок поверхности макрофагов	Врожденный иммунитет	[92]
FAH	Фумарилацетоацетатгидролаза	Тирозинемия 1-го типа (HT1)	[43] ^T
CE7P	Белок-переносчик эфиров холестерина	Атеросклероз	[101] ^z
FBN1	Фибриллин-1	Поражения соединительной ткани	[14]
FOXN1	Фактор транскрипции — развитие волосяного фолликула и тимуса	Т-клеточный иммунодефицит	[69]
IL2RG	Сигнальный компонент интерлейкиновых рецепторов	Т-, В- и NK-клеточный иммунодефицит	[90, 69]
RAG1	Элементы соматической рекомбинации генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов	Т- и В-клеточный иммунодефицит	[71, 86] ^T ; [90, 69]
RAG2			
PRKDC	Полипептид репарации двуниевых разрывов ДНК	Т- и В-клеточный иммунодефицит	[69]
Tyr	Тирозиназа: окисление фенолов, биосинтез меланина	Альбинизм, пигментная меланома	[31]; [75]; [47] ^{BE} ; [48] ^{APOBEC3A-nCas9}
MSTN	Миостатин	Гипермышечный фенотип	[53]; [27]; [47] ^{BE}
PFEX	Фосфат-регулирующая эндопептидаза	Гипофосфатемия, рахит	[80]
DMD	Дистрофин	Мышечная дистрофия Дюшенна	[77]; [47] ^{ABE7}
ANO5	Аноктамин-5, трансмембранный белок (возможный хлоридный канал)	Поясно-конечностная мышечная дистрофия	[79]
DMP1	Белок матрицы дентина 1	Минерализации костей и дентина	[48]
GJA8	Коннексин 50, трансмембранный белок хрусталика глаза	Порошкообразная зоналярная катаракта	[96]
CRYAA	α-кристаллин А	Ядерная форма катаракты	[97]
SRY	Белковый фактор развития семенников	Гермафродитизм	[72, 74]
ATP7B	Транспортирующий медь АТФ-азный протеин Р-типа	Болезнь Вильсона	[36]
PAX4	Ядерный транскрипционный фактор: генерация, дифференциация, развитие и выживание β-клеток, продуцирующих инсулин в поджелудочной железе	Сахарный диабет	[89]
LMNA	Ламин А/С, основные компоненты слоя под мембраной клеточного ядра, называемого ядерной ламиной	Синдром преждевременного старения	[78]; [47] ^{BE}
FUT1,FUT2, SEC1	Фукозилтрансферазы	Межклеточные взаимодействия: гликозилирование белков	[45]
Нoxc13	Фактор транскрипции: развитие волос, ногтей, волосяных луковиц	Эктодермальная дисплазия волос и ногтей 9 (ECTD-9)	[18]
GADD45G	Белок реагирования на стресс	Расщепление нёба	[52]

Примечание: ^z — ZNF-технология; ^T — TALEN-технология; ^{BE, ABE7, APOBEC3A-nCas9} — редакторы оснований, модификация CRISPR.

Note: ^z — ZNF-technology; ^T — TALEN-technology; ^{BE, ABE7, APOBEC3A-nCas9} — base editors, modification CRISPR.

Таблица 2. Кролики, нокаутные по одному гену

Table 2. One-gene knockout rabbits

Ген-мишень	mRNA Cas9 (нг/мкл) / sgRNA (нг/мкл) / кол-во sgRNA	Живые крольчата / всего крольчат / подсажено эмбрионов / МИ эмбрионов	Биаллельны (-/-) / ГМ (-/-, -/+) / всего крольчат	Ссылка
APOE CD36 LDLR RyR2	150/6/1	12/?/94/? 13/?/54/? 28/?/93/? 15/?/60/? Всего: 68/?/301/?	10/10/12 4/11/13 0/9 /28 1/8 /15 Всего: 15/38/68	[92]
LDLR (7 экзон)	49/13 sgRNA1 49/13 sgRNA2	3/3/12/14 4/10/79/82	3/3/3 10/10/10	[51]
LDLR (2, 7 экзон, Δ2800)	40/13/2+2	1/5/?/179	1 ⁺ (Δ2800)	[98]
FBN1 (65 экзон)	200/30/2	28/?/197	26/28	[14]
Il2rg	200/20	8/?/66/?	3 ⁺ /8/8	[90]
TIK1	200/20	5/?/30/?	3 ⁺ /5/5	
TYR (экзон 1)	5 (pX330)	9/9/67/77	1 ⁺ /2/9	[31]
TYR (экз.3, Δ105 п.н.)	100/25/2	17/169/?	1 ⁺ (Δ105)/15/17	[75]
TYR (3'utr, Δ330 п.н.)	100/25/2	4/?/84/92 ¹	2(в т. ч. Δ)/3/4	[73]
TYR (экзон 1) ^{BE3}	200/50	?	6 ⁺ /6/7	[47]
TYR (экзон 1) ^{АРОВЕСЗА}	200/50	?	5 ⁺ /5/5	[48]
MSTN (экзон 1)	180/40/2	20/?/158/?	6 ⁺ /16/20	[53]
MSTN (экзон 1) ^{BE3}	200/50	?	4 ⁺ /6/7	[47]
MSTN (экзоны 1,3; Δ≈4600 п.н.)	200/20/1	2/2/65/85	24/34 (19–экз1, 18–экз2, 13–экз1+экз3, 2-Δ)	[27]
	200/40/2	3/5/56/80		
	100/40/2	29/32/194/218		
PHEX (экзон 1)	200/40/2	26/?/131/?	11 ⁺ /19/26	[80]
GJA8 (экзон 1)	180/40/2	11/11/110/?	0/11/11	[96]
CRYAA (экзон 2)	180/40/2	19/?/85/?	15/19/19	[97]
DMD (экзон 51)	200/50/2	33/?/128/?	22 ⁺ /26/33	[77]
DMD (экзон 9) ^{ABE7}	200/50	?	6 ⁺ /6/7	[47]
ANO5 (экзон 12, 13)	200/40/2	26/?/124/?	?/13/26	[79]
SRY (Sp1)	100/25/2	9♂ из 20/?/391/?	7/9	[72]
SRY (HMG)	100/25/2	1/?/75/?	Мозаичность, химеризм	[74]
PAX4 (экз. 3,5, Δ≈1200 п.н.)	180/40/2	22/?/210/?	15 ⁺ /19/22	[89]
LMNA (экзон 3)	200/50/2	32/?/126/?	29 ⁺ /30/32	[78]
FOXN1	150/6	4/?/20/?	20/21	[69]
RAG2	150/6	3/?/18/?		
IL2RG	150/6	10/?/20/?		
PRKDC	150/6	3/?/18/?		
		Итого: 21/?/76/? (3 рец.)		
FBN1 (экз. 65)	200/30/2	28/?/197/?	26/28	[14]
LMNA (экзон 11) ^{BE3}	200/50	?	7 ⁺ /7/8	[47]

Примечание: ? — данные не приведены; Δ — ожидаемая крупная делеция; гз — гомозиготы.

Note: ? — data not provided; Δ — the expected large deletion; гз — homozygotes.

С использованием локуса *ROSA26* были созданы сотни ТГ животных, в первую очередь — мышей, и клеточных линий, экспрессирующих различные трансгены. Как и у мышей, транскрипты локуса *Rosa26*

кроликов — некодирующие РНК, стабильно экспрессируемые во всех тканях [91]. С применением ДНК-матрицы, содержащей ген зеленого флуоресцентного белка (*EGFP*) с соответствующими фрагментам

Таблица 3. Кролики, нокаутные по нескольким генам одновременно
Table 3. Multi-gene knockout rabbits

Гены-мишени	mRNA Cas9 (нг/мкл) / sgRNA (нг/мкл) / кол-во sgRNA	Живые крольчата / всего крольчат / подсажено эмбрионов / МИ эмбрионов	Характеристика ГМ крольчат(-/-, +/-) / живые крольчата	Ссылка
Il2rg+RAG1	200/20+20	5/?/67/?	2 Il2r ^{-/-} , 3 Il2r ^{+/-} ; 5 RAG1 ^{-/-}	[90]
RAG1+RAG2	150/6	3/15 (1 рец.)	1(RAG1 ^{-/-} +RAG2 ^{-/-})/3/3	[69]
FOXN1+PRKDC+IL-2RG+RAG1 +RAG2	150/6	5/45 (2 рецип.)	1 (FOXN1+PRKDC+RAG1); 1(IL2RG+RAG1); 1(IL2RG); 1 (PRKDC+RAG1); 1 (FOXN1+PRKDC+IL2RG ^{-/-} +RAG1 ^{-/-})/5	
LDLR (2,7 экзон)+APOE (5'utr)	40 / 13 / пара 1+1	4/10/?/96	1(LDLR ^{-/-} , Δ2800); 2 (LDLR ^{+/-} +APOE ^{-/-})/4	[98]
LDLR (2, 7 экзон)+APOE (1 экзон)	40 / 13 / пара 2+1	2/3/?/109	2 (LDLR ^{+/-} +APOE ^{-/-})/2	
FUT1+FUT2+SEC1	200/50/2	31/?/181/?	6 ^{-/-} /8/31	[45]

Таблица 4. Кноук-ин кролики
Table 4. Knock-in rabbits

Ген-мишень	mRNA Cas9 (нг/мкл) / sgRNA (нг/мкл) / кол-во sgRNA	ДНК донор, конц.	Условия введения	KI / KO / всего крольчат / транспл. эмбрионов	Ссылка
rbROSA26 (интрон1)	150/6+RS-1/7,5	Cre-reporter 100 нг/мкл	CP	7/?/20/100	[91]
rbROSA26 (интрон1)	100/6	EGFP 100 нг/мкл	CP	3/29/43/373	[70]
	100/6+RS-1/7,5			10/18/38/146	
АТР7В (экз.8)	20/10/2	ssODNs, (Arg778Leu) 50mM	19 ч после ХГЧ 14 ч после ХГЧ	2/7/14/62 9/5/17/56	[36]
TYR (экз.3)	100/25/2	ssODNs, (K373T) 50mM	CP	5/17/22/158	[76]

Примечание: CP — МИ в цитоплазму; ХГЧ — хорионический гормон человека; ssODNs — одонитевые олигонуклеотиды ДНК.

Note: CP — microinjection into the cytoplasm; ХГЧ — human chorionic hormone; ssODNs — single-stranded DNA oligonucleotides.

Rosa26 плечами гомологии, были получены rbRosa26-EGFP кролики с экспрессией зеленого белка во всех тканях (табл. 4). Эффективность гомологичной рекомбинации (HDR) возрастала при использовании вещества RS-1, успешно применявшегося для получения KI-мышей. Ингибитор процесса негомологичного соединения концов (NHEJ), соединение SCR7, однако, не мешал ДНК-репарацию в пользу HDR [70].

С использованием рекомбинационной системы Cre/loxP получают ТГ животных с условным нокаутом генов, нокаутом генов в нужное время или в нужном месте. Линия кроликов rbRosa26-CRE-reporter содержала

ген tdTomato, инвертированный ген EGFP и введенные последовательности loxP и мутантную loxP2272, дающие возможность Cre-удаления гена tdTomato с последующей экспрессией EGFP [91].

Методические проблемы, связанные с формой и местом введения компонентов

Подавляющее большинство работ с использованием CRISPR/Cas9-технологии в настоящее время проводятся либо с использованием РНК-форм компонентов, либо рибонуклеопротеинового комплекса — белок Cas9 и gRNA. Прямая МИ

в пронуклеус плазмидной ДНК (pX330), содержащей кассеты экспрессии hCas9 и сайт-специфичной sgRNA, — простой и воспроизводимый метод целевого мутагенеза у мышей [56], на кроликах была применена в работе по получению КО *Tyr* кроликов [31, 38].

Компоненты CRISPR/Cas9 в РНК-форме вводят в цитоплазму яйцеклетки. Как правило, для сайт-специфичной модификации гена в эмбрионах млекопитающих вводимые мРНК готовят в несколько этапов: реконструируют вектор экспрессии мРНК, после чего получают нужную молекулу транскрипцией *in vitro* [92]. Время жизни РНК в клетке гораздо меньше, чем у плазмидной ДНК, что также может быть причиной меньшего проявления мозаицизма и неспецифических мутаций. Введение плазмидной ДНК в цитоплазму вместо пронуклеуса приводит к мозаичности у большинства эмбрионов кроликов. Плазмидная форма, в отличие от РНК, более устойчива и не требует особых условий хранения (–20°C против –80°C), работа с ней проще. Рибонуклеопротеиновый комплекс в виде композиции белка Cas9 и sgRNA или белка Cas9 с парой crRNA–tracrRNA вводят в пронуклеус, при этом эффективность последнего варианта в экспериментах на мышах была выше, чем при использовании РНК-форм [8].

Концентрации, количество CRISPR-компонентов. Для Cas9 mRNA и sgRNA в первой работе на кроликах [92] брали 150 и 6 нг/мкл соответственно: более высокие концентрации sgRNA (12, 18 или 24 нг/мкл) не улучшали эффективность целевых мутаций, но могли привести к появлению неспецифических нарушений. При равных концентрациях sgRNA Cas9 mRNA в количестве 200 нг/мкл была токсичнее для развития эмбрионов, чем 100 нг/мкл: выживаемость эмбрионов перед трансплантацией составляла 70% против 89%. Отмечены факты съедания неполноценного потомства

матерями [27]. Концентрация плазмидных форм компонентов CRISPR/Cas9 (pX330) для введения в пронуклеус, как правило, не превышает 5–10 нг/мкл [31].

При использовании двух sgRNA, направленных на ДНК-фрагменты с рядом расположенными PAM-мотивами, эффективность нокаута гена может быть выше, как это продемонстрировано на гене *MSTN* у кроликов [53].

Неспецифичность. Критической проблемой геномного редактирования является эффект неспецифичности CRISPR/Cas9, наблюдаемый, однако, не так уж часто, особенно на полученных живых F0 потомков. В сообщениях о сайт-специфично модифицированных мышах и крысах, полученных с помощью системы Cas9, было очень мало обнаруживаемых нецелевых мутаций [85]. В контексте получения ГМ животных основное внимание к нецелевым мутациям обычно сужают до области экзонов, что делает их анализ возможным и доступным. При использовании строгого способа оценки нецелевых мутаций в возможных мишенях-экзонах (условие — точное совпадение ключевой последовательности 12-ти нуклеотидов плюс NGG в PAM), их не нашли, возможно, из-за низкой концентрации sgRNA — 6 нг/мкл [92]. Напротив, при 20 нг/мкл sgRNA нецелевые мутации были обнаружены у 5-ти из 13-ти крольчат F0 только в одном сайте (с не самой высокой расчетной вероятностью) из нескольких. Побочная мутация не отразилась на рождении и фенотипе *IL2rg* КО-кроликов [90].

При одновременном введении нескольких sgRNA и исследовании 30-ти потенциальных неспецифических мишеней их модификаций не нашли [98]. У КО *PFEX* кроликов при исследовании 14-ти потенциальных сайтов лишние мутации не обнаружили [80]. При использовании pX330 у F0 крольчат не было ни *hCas9* трансгенеза, ни потенциальных неспецифических мутаций [31].

«Технические» моменты получения ГМ кроликов с использованием CRISPR/Cas9-технологии. Исследования КО-кроликов показали, что часто модифицируются сразу оба аллеля (не редкость и гомозиготные модификации), фенотип биаллельных мутаций может быть получен уже в поколении F0 без скрещивания моноаллельных мутантных родителей. Размножение скрещиванием нокаутных гетерозиготных братьев и сестер способно вызвать инбредную депрессию, что может препятствовать распространению и практическому использованию КО-кроликов.

Как и у других видов, при предимплантационном развитии эмбрионов у кроликов может возникнуть мозаичность. Первое деление эмбрионов кроликов происходит примерно через 24–32 ч после оплодотворения, а второе и третье деление — в течение следующих 8-ми ч с образованием 8-клеточных эмбрионов. Этот короткий период на 2- и 8-клеточной стадиях может вызвать более сложные мозаичные модели, чем у других видов.

Дополнительные возможности CRISPR/Cas9. Набор инструментов редактирования генов постоянно расширяется. Появилась возможность редактирования отдельных нуклеотидов ДНК. В 2016 году команда Гарвардского университета сообщила о создании первого метода «редактирования оснований», разработанного для преобразования одного нуклеотида в другой без расщепления двойной спирали генома с использованием направленной ферментативной активности цитидиндезаминазы к конкретным геномным локусам. Этот метод редактирования оснований (Base editor, или BE3) работает в двух случаях превращений: С-Т и G-A [39]. Другой редактор оснований (ABE7) преобразует Т-С или А-G [25]. Оба метода имеют высокую точность и могут применяться для исправления большинства однобуквенных мутаций, присутствующих в геноме.

При использовании систем BE3 и ABE7.10 для создания точечных замен оснований в генах кролика *Mstn*, *Dmd* и *Tial* эффективность, проверенная на бластоцистах, составляла 53–88%. Эффективность точечных замен у F0 кроликов по генам *Mstn*, *Tyr*, *LMNA*, *Dmd* составляла в среднем 86,5% (табл. 2). Частота инделей, соответственно, уменьшалась [47]. Однако при использовании BE3 часто возникают нежелательные замены С-Т, когда в «окне редактирования» находится несколько С-нуклеотидов. Еще один редактор оснований с использованием однодоменной цитидиндезаминазы человека (APOBEC3A (eA3A)) предпочтительно дезаминирует цитидины в конкретных мотивах в соответствии с иерархией TCR>TCY>VCN [25]. Если в первой работе с использованием BE3-редактора частота случайных соседних С-Т мутаций гена *Tyr* была 86%, в следующем эксперименте с использованием APOBEC3A-nCas9-редактора в целевой точечной замене все кролики были гомозиготны (табл. 2), частота лишних замен была 28%. Все F0 были альбиносы [46]. Полученные результаты демонстрируют перспективность применения редакторов оснований в создании моделей, точно имитирующих генетические заболевания человека.

Мозаицизм как геномное разнообразие

Ранее мы показали, что попадание плазмидной формы ДНК в цитоплазму приводит к почти 100%-ной мозаичности, поскольку клетки могут претерпевать изменения во время последовательных этапов онтогенеза, то есть подвергаться различным постзиготическим мутациям, которые наследуют все дочерние клетки [102].

Многоклеточный организм, в структуре которого присутствуют генетически разнородные популяции клеток, произошедшие из общей зиготы, называется *мозаик*. Мозаицизм может существовать как в соматических

тических клетках, так и в клетках зародышевой линии [13]. Если мозаицизм встречается только в популяции соматических клеток, фенотипический эффект будет зависеть от размера популяции мозаичных клеток и сроков возникновения мутаций. Такой признак не будет передан потомству [13]. А если мозаицизм встречается только в популяции клеток зародышевой линии, индивидуум не будет иметь фенотипических проявлений, но его потомки унаследуют данный признак. Также возможно, что в случае индукции мозаицизма в раннем онтогенезе как соматические, так и клетки зародышевой линии будут мозаичны [17]. Существует множество возможных механизмов развития мозаицизма: соматические мутации, эпигенетические изменения, нарушения структуры и/или количества хромосом [13, 102].

Хромосомный мозаицизм проявляется с довольно высокой частотой в эмбриональных тканях, достигая 25% в спонтанных абортусах. Ограниченность мозаицизма только одной специфической тканью — известный феномен. Ещё в 1983 г. Калоушек и Дилл описали хромосомный мозаицизм, ограниченный только плацентой (ограниченный плацентарный мозаицизм) [34].

Вполне резонно предположить, что самой обычной генетической причиной пренатальной смерти может быть хромосомный мозаицизм. Можно прийти к заключению, что ограниченный определённой тканью мозаицизм — причина дисфункции этой ткани, как это было продемонстрировано на примере заболеваний головного мозга, на мозге плодов и тканях яичника. Следовательно, при поиске роли хромосомного мозаицизма в патологии нужно напрямую изучать ткани, подвергшиеся патологическим изменениям.

С хромосомным мозаицизмом связаны некоторые хромосомные болезни человека, обычно трисомии: мозаичную форму могут иметь синдром Дауна (око-

ло 2%), синдром Клайнфельтера, синдром Шерешевского — Тёрнера (20–50% больных), синдром Эдвардса (около 10%), синдром де ля Шапеля; при этом, как правило, часть клеток характеризуется обычным набором хромосом, а часть клеток — наличием дефектной хромосомы. Если число мутантных клеток при мозаицизме составляет менее 10%, то картина синдромов менее выраженная. Мозаицизм по половым хромосомам (XX/XY) в ряде случаев приводит к интерсекс-состояниям [34].

С мозаичными формами генных болезней не следует путать мозаицизм гонад. Мозаицизм гонад является частным случаем органного мозаицизма, возникающего на более поздних стадиях эмбрионального развития в процессе органогенеза. Наличие его у клинически здорового индивида может обусловить рождение детей с полной формой доминантной наследственной болезни (например, гемофилии) [34].

Не так давно было обнаружено, что соматический хромосомный мозаицизм характерен для развивающегося головного мозга человека в большом числе нормальных эмбрионов. Более того, было установлено, что увеличение мозаичной анеуплоидии в развивающемся мозге человека — интегральный компонент развития центральной нервной системы [34].

Трансгенные и нокаутные кролики в биомедицине

Последовательности генов кроликов имеют гомологию с генами человека больше, чем у грызунов. Ранний эмбриогенез и гастрюляция (процесс образования зародышевых листков) кролика более близки к человеку, что позволяет использовать кролика как репродуктивную модель [20]. Тератогенный эффект талидомида, не проявлявшийся на мышах, был подтвержден на кроликах [42]. Заболевания легких, их патофизиология, воспалительные реакции модели-кролика, особенно в случае аст-

мы, сопоставимы с теми, что встречаются у человека: кроликов используют в лекарственных скрининговых тестах на аллергические реакции как модель для исследования терапии стволовыми клетками [37], заболеваний глаз (дегенерация сетчатки, синдром сухого глаза, глаукома, катаракта, увеит и др.) [40, 100].

Моделирование опухолей у кроликов применяется достаточно давно. Преимущественно используется опухоль VX2 (плоскоклеточная карцинома). Перевивку этой опухоли применяют в экспериментальной онкологии для моделирования злокачественных новообразований головы и шеи, почки, головного мозга, печени [62], при исследовании колоректального рака с метастазами в печень [67]. Для исследования образования метастазов лимфатическая система кролика подходит больше, чем у грызунов [61].

Сердечно-сосудистые заболевания остаются ведущей причиной заболеваемости и смертности в развитых странах. Мыши — не самая подходящая модель для изучения этих болезней не только из-за размера: у грызунов преобладает α -тяжелая цепь миозина (*MHC*), у крупных млекопитающих, включая кроликов и людей, экспрессируется преимущественно β -*MHC*. Трансгенные по мутантному гену β -*MHC* человека кролики — модель для изучения гипертрофической кардиомиопатии человека [49]. Трансгенные кролики используются для изучения атеросклероза, нарушений ионных каналов сердца, индуцированной тахикардией кардиомиопатии [61]. Кролики — объект для моделирования артериального тромбоза [5], остеопороза [66].

Для изучения защитного иммунитета, индуцированного профилактической вакцинацией, например вирусом простого герпеса (HSV-1), гуманизированные HLA-трансгенные кролики во многих случаях — более корректная модель, чем HLA-трансгенные мыши [15]. На кроликах

изучают инфекционные заболевания человека, включая СПИД (вызванный ВИЧ1), Т-лимфотропный вирус человека первого типа (HTLV-I), вирус простого герпеса типа 1, туберкулез, сифилис [65], исследуют острую печеночную недостаточность, заболевания, вызванные норовирусами, папилломавирусами [19].

На кроликах исследуют обусловленные питанием метаболические синдромы [9, 50]. В отличие от мышей кролики чувствительны к холестерину: как у людей, у них могут развиваться тяжелые гиперхолестеринемии. Природные мутанты с наследуемой гиперлипидемией несут мутацию сдвига рамки считывания в гене рецептора липопротеина низкой плотности, и у них развивается атеросклероз даже при нормальном питании. Модели кролика, в т. ч. и трансгенные, активно используются для исследования липидного обмена, атеросклероза, остеоартроза [20, 21].

Для изучения *метаболизма липидов и липопротеинов* необходимы разные модели: если *APOE* KO-кроликов, чтобы вызвать гиперлипидемию, необходимо держать на диете с высоким содержанием холестерина, нужны и модели с возможностью развития метаболических заболеваний на обычном рационе. Модификация гена *LDLR* созданием инделей в 7-м экзоне (кодирует консервативный домен, подобный предшественнику эпидермальный фактор роста (EGF)) привела к получению семи кроликов *LDLR* KO, и все они содержали биаллельные модификации. Моделирование третичной структуры модифицированных белков *LDLR* KO-кроликов показало отличие каждого из них от WT типа. У всех F0 кроликов на нормальной диете спонтанно развивались гиперхолестеринемия и атеросклероз, выраженные как на биохимическом, так и на гистологическом уровнях. Такая модель полезна для изучения семейной гиперхолестеринемии человека [51].

При одновременном использовании gRNA к разным экзонам гена *LDLR* был проведен нокаут гена как большой (2800 п. н.), так и мелкими делециями в сайтах-мишенях (табл. 1). С высокой эффективностью был осуществлен и одновременный нокаут генов *LDLR/APOE*, в т. ч. с большой делецией в гене *LDLR* (табл. 3). У КО-кроликов была выраженная гиперлипидемия с уровнем холестерина в 10 раз большим по сравнению с кроликами дикого типа. У КО F0 кроликов развивался аортальный и коронарный атеросклероз [98]. Ожирение и **метаболический синдром** — проблемы социально-медицинского значения. Признанная экспериментальная модель для изучения наследственной гиперхолестеринемии, атеросклероза человека — кролики линии Ватанабе с врожденной гиперхолестеринемией, вызванной генетическим нарушением функции рецептора *LDLR*. Диеты с высоким содержанием жира, холестерина и сахара приводят к быстрому развитию гиперхолестеринемии, атеросклероза, сосудистых изменений. *APOE* КО-кролики с точки зрения их липидного и липопротеинового профилей сравнимы с кроликами Ватанабе и могут быть полезной моделью для изучения гиперлипидемии человека [57]. Трансгенные кролики с измененной экспрессией специфических генов позволяют уменьшить продолжительность экспериментальных исследований, демонстрируют быструю и сильную реакцию на диету [50].

Быстрое и эффективное получение **иммунодефицитных** кроликов было выполнено комплексной трансплантацией эмбрионов с мишенями в генах *FOXN1*, *RAG2*, *IL2RG*, *PRKDC*. Группы эмбрионов, микроинъекцированных sgRNA к этим генам, объединяли для трансплантации всего трем реципиентам. В результате у 20-ти из 21-го крольчат были индели в соответствующих генах (табл. 2). При одновременном таргетинге двух соседних генов *RAG1* и *RAG2* (меж-

ду ними 6,1 т. п. н.) у всех крольчат были индели по обоим генам, у одного — биалельные гомозиготные мутации. При одновременной МИ сразу пяти sgRNA к генам *FOXN1*, *RAG1*, *RAG2*, *IL2RG* и *PRKDC* были получены крольчата с мутациями от одного до четырех генов (табл. 3) [69]. У кроликов был тяжелый комбинированный иммунодефицит, характеризующийся отсутствием или выраженной гипоплазией тимуса и белой пульпы селезенки, а также отсутствием незрелых и зрелых Т- и В-лимфоцитов в периферической крови. Полный анализ крови показал тяжелую лейкопению и лимфоцитопению, сопровождающуюся тяжелой нейтрофилией [68].

Тирозиназа — медьсодержащий фермент, катализирующий окисление фенолов, играет ключевую роль в биосинтезе меланина. Пигментная меланома, злокачественная опухоль, берущая свое начало из меланоцитов, характеризуется повышенной активностью тирозиназы. Мутации гена тирозиназы нарушают процесс синтеза меланина и приводят к альбинизму глаз и кожи, изменению пигментации кожи. КО *Tyr* мыши и крысы характеризуются разнообразием окраски шерсти [58, 95], что сразу наглядно демонстрирует эффективность ГМ. В первом опыте по КО гена *Tyr* кролика использовали плазмиду рХ330 с кодирующей последовательностью Cas9 и gRNA, разработанную Mashiko и сотр. для мышей [56]. Кролики КО *Tyr* имели окрас по типу голландского кролика [31]. Для получения нефункциональной тирозиназы использовали пару sgRNA для образования крупной делеции. Эффективность каждой sgRNA была около 80%, но делеции крупного фрагмента при совместной МИ двух sgRNA была менее 10%. С применением 4-х sgRNA (по паре к каждому сайту) эффективность крупной делеции выросла до 17%. Возможно, одновременное использование нескольких sgRNA снижает эффективность отдельных из них, и для получения

направленной крупной делеции требуется не более четырех sgRNA [75]. На примере нокаута гена *Tyr* была показана важность 3'-некодируемой последовательности (utr) с *polyA*-мотивами в его нормальном функционировании: в результате ее удаления у кроликов (делеция по одному аллелю) был серый цвет шерсти и уменьшение уровня меланина в волосах фолликулах и радужках глаз [73].

Миостатин — белок, подавляющий рост и дифференцировку мышечной ткани у млекопитающих. Нокаут гена *Mstn*, ранее успешно осуществленный для мышей, коз, свиней и КРС, с высокой эффективностью был получен и у кроликов [53]. Кролики имели типичный фенотип с гипертрофией и/или гиперплазией мышц, увеличенную массу тела. Полученный фенотип сохранялся в F1, при этом у новорожденных крольчат не было существенной разницы в размере тела и весе по сравнению с WT. В работе др. группы ученых мишенью были выбраны 1-й и 3-й экзоны гена *Mstn*, в т. ч. с целью получения большой делеции. Было отмечено много мертворождений, ранней смертности. У большинства ГМ крольчат был увеличенный язык. Почти у половины крольчат были индели в обоих экзонах, у двух — большие делеции. По сравнению с предыдущей работой, у *Mstn* KO новорожденных крольчат был повышенный вес [27]. Такие исследования важны для выяснения безопасности KO *MSTN* с/х животных, получаемых с целью увеличения мясной продуктивности.

Связанная с X-хромосомой **гипофосфатемия** (XLH) — наиболее распространенная причина наследуемого рахита, встречающаяся у людей с частотой 1/20000. Инактивация или мутация гена *PHEX* приводит к гипофосфатемии и дефектам минерализации костей, хрящей, зубов. *PHEX* KO-кролики имели типичный для заболевания фенотип. Крольчата начинали умирать после рождения: в течение 15-ти недель

смертность составляла 90%, самцы погибали в течение двух месяцев [80].

Другое связанное с X-хромосомой заболевание — **мышечная дистрофия Дюшенна** (DMD) возникает в результате мутаций в гене дистрофина *DMD*. Встречаемость заболевания — 1 из 3500 новорожденных мальчиков. Как биомодель DMD применяют мышей *Mdx* (*Dmd*), однако доклинические исследования на этой модели плохо соотносятся с состоянием DMD-пациентов. У KO *Dmd* кроликов понижалась физическая активность, повышался уровень креатинкиназы в сыворотке крови, наблюдался прогрессирующий мышечный некроз и фиброз, имелись и др. признаки, очень похожие на таковые у человека с DMD. Эффективность получения *Dmd* KO-кроликов была очень высокой: 78% F0 крольчат, из которых 85% были *Dmd*^{-/-} [77].

Другие дистрофии — пояснично-конечностная мышечная дистрофия типа 2L и мышечная дистрофия Миоши типа 3 — связаны с мутациями в гене *ANO5*. Мыши с полным нарушением транскриптов *ANO5*, как биомодели, не проявляли явных фенотипов мышечной дистрофии, тогда как у кроликов с инделями в 12-м и/или 13-м экзоне *ANO5* были типичные признаки соответствующей мышечной дистрофии [79].

DMP1 — белок, необходимый для правильной **минерализации кости и дентина**, присутствует в различных клетках костной и зубной тканей. KO *Dmp1* мыши имеют ограничения для изучения гипофосфатемического рахита (ARHR). KO *Dmp1* кролики имели многие особенности ARHR человека и после рождения погибали в течение 8-ми недель из-за развития тяжелого дефекта костной микроархитектуры [46].

Синдром Марфана — заболевание наследственного типа, при котором поражается **соединительная ткань** — проявляется признаками изменения скелета, сердца и сосудов, глаз, кожи, ЦНС, легких. Синдром развивается в результате мутации

гена *FBNI*, кодирующего фибриллин-1, при недостатке которого волокна соединительной ткани становятся чрезмерно растяжимыми и менее устойчивыми к деформациям. В наибольшей степени повреждению подвержены сосуды и связки. При модификации 65-го экзона гена *FBNI* у фибриллина-1 обрезается С-конец, необходимый для его секреции. *FBN^{+/+}* кролики имели все признаки синдрома Марфана: мышечное истощение, глазной синдром, расширение аорты и липодистрофия, снижение сборки микрофибрилл во внеклеточном матриксе (табл. 2) [14].

На сегодняшний день идентифицировано 22 гена, мутации в которых ответственны за развитие наследственной врожденной **катаракты**. С целью скрининга лекарств для ее профилактики и лечения были получены кролики с нокаутом некоторых генов, кодирующих критичные для зрения белки. Мутации в белке *коннексин 50* (*Cx50* или *GJA8*) приводят к возникновению порошкообразной зонулярной катаракты. При получении КО *GJA8* кроликов эффективность мутации была 98,7% у эмбрионов и 100% у крольчат, у которых были обнаружены микрофтальмия, малый размер хрусталика и катаракта [96]. Мутации в гене *CRYAA* белка, играющего важную роль в поддержании прозрачности хрусталика, структуры др. его белков, — одна из причин развития ядерной формы врожденной катаракты. КО *CRYAA* крольчата имели мутации гена *CRYAA* с инделями в диапазоне 3–52 п. н., без неспецифических мутаций, у большинства была катаракта разной степени [97].

Гермафродитизм — проявление аномалий генов, регулирующих определение пола, развитие гонад или экспрессию гормонов и их рецепторов в эмбриональном развитии во время половой дифференцировки. Один из генов — *SRY* (*Sex-determining Region Y*), расположенный на Y-хромосоме большинства млекопитающих, кодирует белковый

фактор развития семенников и инициирует развитие организма по мужскому типу. Мутация или дисфункция его консервативного домена *HMG* (ДНК-связывающегося домена белка *SRY*) индуцирует синдром реверсии пола у XY-носителей. Мутации *Sp1*-связывающего сайта (*Sp1* — фактор транскрипции, необходимый для дифференциации сперматозоидов) в 5'-фланкирующей области *SRY* также связаны с клиническим синдромом реверсии пола. В первом исследовании при введении мутаций в *Sp1*-сайте большинство полученных крольчат-самцов КО *SRY-Sp1* имели женские признаки и были бесплодны, но при гормональной обработке могли стать «суррогатными матерями» [72]. При введении мутации в область *HMG* был получен кролик-гермафродит, имевший яичники, семенники и матку одновременно (табл. 2) [74].

С возникновением и развитием **сахарного диабета** связаны нарушения множества генов, *PAX4* — один из них. У *PAX4^{-/-}* кроликов наблюдали замедление роста, стойкую гипергликемию, снижение количества инсулинпродуцирующих β-клеток и увеличение количества глюкагонопродуцирующих α-клеток. Фенотипы, ассоциированные с заболеванием, включая диабетическую нефропатию, гепатопатию, миопатию и кардиомиопатию, также наблюдались только у *PAX4^{-/-}* кроликов (табл. 2) [89].

Причиной развития **синдрома преждевременного старения**, известного как прогерия, или синдром Гилфорда, является мутация гена *LMNA*. При этом очень редком наследственном заболевании у детей развиваются симптомы, ассоциированные с преклонным возрастом, в т. ч. выпадение волос, уменьшение слоя подкожной жировой клетчатки, атеросклероз и изменения скелета. Такие дети обычно умирают от болезней сердечно-сосудистой системы в подростковом возрасте. Для понимания патофизиологических механизмов синдрома преждевременного и процессов нор-

мального старения человека были получены *LMNA* КО-кролики. Все они имели пониженную двигательную активность, аномально жесткий скелет, укороченный рост и умерли в течение 22-х дней. У кроликов были кардиомиопатия, мышечная дистрофия, костные и суставные аномалии, липодистрофия. Эффективность получения *LMNA* ГМ кроликов была 94%: 29 из 30-ти ГМ крольчат были *LMNA*^{-/-} (табл. 2) [78].

Одновременная **мутация нескольких гомологичных генов** с использованием общих для этих генов sgRNA была выполнена на группе генов трех фукозилтрансфераз (*FUT1*, *FUT2* и *SEC1*). Эти ферменты участвуют в биосинтезе фукозилированных гликанов, необходимых для многочисленных биологических процессов, таких как сигнальная трансдукция, взаимодействие хозяина и микрофлоры, развитие тканей, прогрессирование рака и др. Нуклеотидные последовательности генов *FUT1*, *FUT2* и *SEC1* имеют высокую гомологию, что позволяет подобрать общие для них sgRNA. Были получены кролики с КО *FUT1*, *FUT2* и *SEC* в разных комбинациях со сниженной активностью ферментов (табл. 3). Из восьми ГМ крольчат у четырех были мутации одновременно по двум генам, у одного — биаллельные мутации сразу по трем генам [45].

Эктодермальная дисплазия 9 (ECTD-9) характеризуется гипотрихозом и дистрофией ногтей без других эктодермальных нарушений и вызывается мутациями в гене *HOXC13*. Мыши и свиньи с мутациями в *Hoxc13* не дают гипотрихозный фенотип, тогда как у *Hoxc13*^{-/-} кроликов шерстный покров отсутствует. При резком снижении количества волосных луковиц увеличивалось количество сальных желез, и такой дисбаланс соответствовал клиническим проявлениям заболевания. *Hoxc13*^{-/-} кролики могут быть адекватной моделью для изучения ECTD-9 человека, дерматологических заболеваний, таких

как акне и гипотрихоз, в доклинических исследованиях [18].

Расщепление нёба («заячья губа») — один из наиболее распространенных врожденных дефектов у человека. Как один из факторов, влияющих на риск развития этого заболевания, определен ген *GADD45G* из семейства генов, ответственных за реагирование на стресс. Из-за тяжелых черепно-лицевых дефектов *GADD45G*^{-/-} крольчата умирали после рождения: впервые была показана роль гена *GADD45G* в формировании верхней челюсти [52].

Болезнь Вильсона — врожденное или приобретенное нарушение метаболизма меди, приводящее к тяжелейшим наследственным болезням центральной нервной системы и внутренних органов. Описано более 600 мутаций гена *ATP7B*, приводящих к болезни Вильсона. Из-за недостатка белка *ATP7B* (транспортирующий медь АТФ-азный протеин Р-типа) нарушается трансмембранный транспорт меди, встраивание ионов меди в белок церулоплазмин. С использованием CRISPR/Cas9-технологии в сочетании с одонитевыми олигонуклеотидами ДНК (ssODNs, плечи гомологии по 46 нуклеотидов) была сгенерирована точечная мутация гена *ATP7B* для моделирования наиболее часто встречаемого типа мутации у азиатов (Arg778Leu) с болезнью Вильсона. Кролики, несущие аллель с мутантным *ATP7B*, умирали примерно в трехмесячном возрасте. Содержание меди в их печени было увеличено в девять раз, что аналогично пятикратному увеличению, наблюдаемому у людей с болезнью Вильсона. Авторы исследования отмечали высокую эффективность сайт-специфичных точечных мутаций при МИ РНК в зиготы на более ранних стадиях: 53% против 14% при МИ зигот через 14 и 19 ч соответственно после обработки ХГЧ [36].

В другой работе тоже была сгенерирована точечная мутация гена *TYR* с изменением 373-го кодона, приводящая к замене

в тирозиназе треонина на лизин. Мутация T373K в гене *TYR* снижала активность фермента: у кроликов *TYR-K373T* пигментация лукович шерсти и радужки глаз была нарушена [76].

Генная терапия

Генная терапия — совокупность генно-инженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний. Это новая и бурно развивающаяся область, ориентированная на исправление дефектов, вызванных мутациями ДНК, или придания клеткам новых функций, альтернативная стратегия лечения многих заболеваний. Иными словами, это способ лечения или коррекции заболевания путем искусственного введения в клетку новой генетической информации, призванной поправить ту, с которой связана болезнь. Животные-модели, имитирующие условия заболевания человека, в генной терапии необходимы при оценке использования вирусных векторов — их безопасности, эффективности, дозировки, локализация экспрессии трансгена в доклинических испытаниях препаратов генной терапии. Наиболее часто в исследованиях генной терапии используются мыши, крысы, кролики, свиньи, гуманизированные мыши [27]. Кролик, классическая модель для изучения офтальмологических и сердечно-сосудистых заболеваний, используется в качестве модели генной терапии этих же заболеваний. В доклинических исследованиях внутримышечное введение кролику плазмидной ДНК, кодирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), усиливало коллатеральное развитие сосудов и перфузию тканей на модели ишемии задней конечности [78]. Эффективным для этих целей было и введение плазмиды с геном фактора роста гепатоцитов (HGF) [81]. Было показано предотвращение об-

разования артериального тромба путем локальной сверхэкспрессии тканевого активатора плазминогена (ТАП) [87] введением в бедренную артерию кролика рекомбинантного аденовирусного вектора, экспрессирующего ТАП человека.

Описано успешное применение гена IL-10 с использованием тетрациклин-зависимого промотора в качестве терапевтического при генной терапии аутоиммунного дакриoadенита (воспаление слезных желез) у кроликов [82]. Неоваскуляризация — патологическое разрастание сосудов там, где в норме их быть не должно. В офтальмологии выделяют неоваскуляризацию роговицы и хориоидальную неоваскуляризацию. Протеогликан декорин способен подавлять этот процесс. Введение гена декорина в роговицу заметно снижало ее VEGF-индуцированный ангиогенез [59].

На кроликах проверяли эффективность, безопасность, уровень экспрессии трансгена человеческого фактора IX (hFIX) в зависимости от дозы, серотипа аденоассоциированного вирусного вектора, способного вызывать у человека иммунный ответ [22].

Генно-направленная ферментативная пролекарственная терапия — «троянская» суицидальная генная терапия, представляющая собой нацеленную на опухоль систему доставки гена, кодирующего фермент, преобразующий безвредное пролекарство в цитотоксические метаболиты *in situ*. Описано исследование, что внутриартериальное введение стволовых клеток мезенхимы, трансдуцированных оптимизированным геном (MSC-CYP2B6TM-RED), с последующим внутривенным введением циклофосфамида (CPA) в опухоль печени кролика VX2 привело к 78%-му некрозу опухоли с уменьшением метастазов [63].

Продуценты диагностических и терапевтически активных белков — еще одна область применения кроликов, в т. ч. и трансгенных. Кроличьи моноклональные антитела от использования в сугубо

научных целях имеют все более широкое терапевтическое и диагностическое применение [85]. Для диагностических приложений, в т. ч. нескольких видов рака, FDA утверждено использование ряда кроличьих поли- и моноклональных антител (pAbs, mAbs). Кроличьи mAbs к рецептору программируемой клеточной смерти (PD-1) — ниволумаб и атезолизума (последний пока не зарегистрирован в России) — используются в таргетной иммунотерапии рака. До III фазы клинических испытаний дошел уже целый ряд mAbs [55].

Трансгенные животные перспективны в качестве биореакторов для продукции фармацевтических белков с молоком или кровью. Кролик — самое маленькое животное, из которого могут быть получены рекомбинантные белки фармацевтического назначения в экспериментальном и промышленном масштабе. Содержание белка в молоке кроликов значительно выше, чем в коровьем (14% против 5%) [54]. Кролики могут найти применение для производства с молоком фармакологических белков, не требуемых в больших количествах: рекомбинантный ингибитор С1 эстеразы человека (Pharming BV) для лече-

ния пациентов с наследственным ангионевротическим отеком из молока ТГ кроликов разрешен к применению [10].

Закключение

С развитием новых технологий редактирования генома, особенно CRISPR/Cas9 и его модификаций, стало возможным с высокой эффективностью получать все большее количество животных с точно заданными генетическими модификациями для решения самых разнообразных задач научного и прикладного характера. Кролики как биомодели заболеваний человека, биореакторы-продуценты фармакологически активных рекомбинантных белков становятся все более востребованным видом лабораторных животных. Эффективность получения ГМ кроликов методом микроинъекции зигот сравнима с эффективностью получения трансгенных мышей. Несмотря на очевидные успехи зарубежных, особенно китайских, генетиков в создании генно-редактированных кроликов, такие работы в России практически отсутствуют. Тем не менее опыт получения трансгенных кроликов в нашей стране есть [1].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Езерский В.А., Шишиморова М.С., Тевкин С.И., Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Безбородова О.А. и др. Интеграция и тканеспецифическая экспрессия гена лактоферрина человека в молочной железе трансгенных кроликов. *Проблемы биологии продуктивных животных*. Боровск. 2013;4:33–52. [Ezerskii V.A., Shishimorova M.S., Tevkin S.I., Trubitsina T.P., Koloskova E.M., Bezborodova O.A., et al. Integratsiya i tkanespetsificheskaya ekspressiya gena laktoferrina cheloveka v molochnoy zheleze transgennykh krolikov [Integration and tissue-specific expression of human lactoferrin gene in mammary gland of transgenic rabbits]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* [Problems of biology of productive animals]. 2013;4:33–52. (In Russian)].
2. Каркищенко В.Н., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В. и др. Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека NAT1 и NAT2. *Биомедицина*. 2016;(1):74–85. [Karkischenko V.N., Bolotских L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., et al. 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)].
3. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В. и др. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека. *Биомедицина*. 2016;(1):52–66. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Bolotских L.A., Semenov Kh.Kh., Kapanadze G.D., Petrova N.V., et al. 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)].
- 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 (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological studies (successes, failures and prospects)]. *Biomedicine*. 2014;(3):4–22. (In Russian)].
 - Макаренко И.Е., Калатанова А.В., Ванатиев Г.В., Мужикян А.А., Шекунова Е.В., Буренков П.В. и др. Выбор оптимального вида животных для моделирования экспериментального артериального тромбоза. *Международный вестник ветеринарии*. 2016;2:116–125. [Makarenko I.E., Kalatanova A.V., Vanatiev G.V., Muzhikyan A.A., Shekunova E.V., Burenkov P.V., et al. Vybór optimal'nogo vida zhivotnykh dlya modelirovaniya eksperimental'nogo arterial'nogo tromboza [Selection of the optimal animal species for modeling experimental arterial thrombosis]. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii [International journal of veterinary medicine]*. 2016;2:116–125. (In Russian)].
 - Рыбакова А.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Использование кроликов в доклинических исследованиях. *Международный вестник ветеринарии*. 2016;4:102–106. [Rybakova A.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Ispol'zovanie krolikov v doklinicheskikh issledovaniyakh [Use of rabbits in preclinical studies]. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii [International journal of veterinary medicine]*. 2016;4:102–106. (In Russian)].
 - Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Герашенков Г.А., Кулуев Б.Р., Рожнова Н.А., Матнязов Р.Т. и др. Биоинформатические ресурсы для CRISPR/Cas редактирования геномов. *Биомика*. 2017;9(3):203–228. [Chemeris D.A., Kir'yanova O.Yu., Gerashchenkov G.A., Kuluev B.R., Rozhnova N.A., Matniyazov R.T., et al. Bioinformaticheskie resursy dlya CRISPR/Cas redaktirovaniya genomov [Bioinformatics resources for crispr/Cas genome editing]. *Biomica*. 2017;9(3):203–228. (In Russian)].
 - Aida T., Chiyo K., Usami T., Ishikubo H., Imahashi R., Wada Y., et al. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol*. 2015;16(87):11.
 - Arias-Mutis O.J., Marrachelli V.G., Ruiz-Sauri A., Alberola A., Morales J.M., Such-Miquel L., et al. Development and characterization of an experimental model of diet-induced metabolic syndrome in rabbit. *PLoS One*. 2017;23;12(5):e0178315.
 - Bosze Z., Hiripi L., Carnwath J.W., Niemann H. The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic. Res*. 2003;12:541–553.
 - Bosze Z., Houdebine L.M. Application of rabbits in biomedical research: a review. *World Rabbit Sci*. 2006;14:1–14.
 - Bosze Z., Major P., Baczkó I., Odénig K.E., Bodrogi L., Hiripi L., et al. The potential impact of new generation transgenic methods on creating rabbit models of cardiac diseases. *Prog. Biophys. Mol. Biol*. 2016;121:123–130.
 - Campbell I.M., Shaw C.A., Stankiewicz P., Lupski J.R. Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. *Trends Genet*. 2015;31(7):382–392.
 - Chen M., Yao B., Yang Q., Deng J., Song Y., Sui T., et al. Truncated C-terminus of fibrillin-1 induces Marfanoid-progeroid-lipodystrophy (MPL) syndrome in rabbit. *Dis. Model. Mech*. 2018;11(4). PII: dmm031542. DOI: 10.1242/dmm.031542.
 - Chentoufi A.H., Dasgupta G., Christensen N.D., Hu J., Choudhury Z.S., Azeem A., et al. A novel HLA (HLA-A_0201) transgenic rabbit model for preclinical evaluation of human CD81 T cell epitope-based vaccines against ocular herpes. *J. Immunol*. 2010;184:2561–2571.
 - Chesné P., Adnot P.G., Viglietta C., Baratte M., Boulanger L., Renard J.P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol*. 2002;20:366–369.
 - Darby C.A., Fitch J.R., Brennan P.J., et al. Samovar: Single-Sample Mosaic Single-Nucleotide Variant Calling with Linked Reads. *iScience*. 2019;18:1–10.
 - Deng J., Chen M., Liu Z., Song Y., Sui T., Lai L., et al. The disrupted balance between hair follicles and sebaceous glands in Hoxc13-ablated rabbits. *FASEB J*. 2019;33(1):1226–1234. DOI: 10.1096/fj.201800928RR.
 - Esteves P.J., Abrantes J., Baldauf H.M., BenMohamed L., Chen Y., Christensen N., et al. The wide utility of rabbits as models of human diseases. *Exp. Mol. Med*. 2018;50(5):66. DOI: 10.1038/s12276-018-0094-1.
 - Fan J., Chen Y., Yan H., Niimi M., Wang Y., Liang J. Principles and Applications of Rabbit Models for Atherosclerosis Research. *J. Atheroscler. Thromb*. 2018;25(3):213–220. DOI: 10.5551/jat.RV17018.
 - Fan J., Kitajima S., Watanabe T., Xu J., Zhang J., Liu E., et al. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacol. Ther*. 2015;146:104–119. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.09.009.
 - Favaro P., Finn J.D., Siner J.I., Wright J.F., High K.A., Arruda V.R. Safety of liver gene transfer following peripheral intravascular delivery of adeno-associated virus (AAV)-5 and AAV-6 in a large animal model. *Hum. Gene Ther*. 2011;22(7):843–852.
 - Fischer B., Chavatte-Palmer P., Viebahn C., Santos A.N., Duranthon V. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*. 2012;144:1–10. DOI: 10.1530/REP-12-0091.

24. Flisikowska T., Thorey I.S., Offner S., Ros F., Lifke V., Zeitler B., et al. Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PLoS One*. 2011;6:e21045.
25. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., et al. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017;551(7681):464–471. DOI: 10.1038/nature24644.
26. Gehrke J.M., Cervantes O., Clement M.K., Wu Y., Zeng J., Bauer D.E., et al. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nat. Biotechnol.* 2018;36(10):977–982. DOI: 10.1038/nbt.4199.
27. Gopinath C., Nathar T.J., Ghosh A., Hickstein D.D., Nelson E.J.R. Contemporary Animal Models For Human Gene Therapy Applications. *Curr. Gene. Ther.* 2015;15(6):531–540.
28. Guo R., Wan Y., Xu D., Cui L., Deng M., Zhang G., et al. Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 2016;15;6:29855. DOI: 10.1038/srep29855.
29. Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E. Jr., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 1985;315:680–683.
30. Honda A., Hirose M., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Shimozawa N., et al. Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reprod. Biomed. Online*. 2008;17:706–715.
31. Honda A., Hirose M., Sankai T., Yasmin L., Yuzawa K., Honsho K., et al. Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. *Exp. Anim.* 2015;64:31–37.
32. Honda A., Ogura A. Rabbit models for biomedical research revisited via genome editing approaches. *J. Reprod. Dev* 2020. 2017;63(5):435–438. DOI: 10.1262/jrd.2017-053.
33. Houdebine L.M., Fan J. *Rabbit biotechnology: rabbit genomics, transgenesis, cloning and models*. Heidelberg/Berlin/New York: Springer Science & Business Media, 2009.
34. <https://monographies.ru/en/book/section?id=10062>
35. Ji D., Zhao G., Songstad A., Cui X., Weinstein E.J. Efficient creation of an APOE knockout rabbit. *Transgenic Res*. 2015;24:227–235.
36. Jiang W., Liu L., Chang Q., Xing F., Ma Z., Fang Z., et al. Production of Wilson Disease Model Rabbits with Homology-Directed Precision Point Mutations in the ATP7B Gene Using the CRISPR/Cas9 System. *Sci. Rep.* 2018;8(1):1332. DOI: 10.1038/s41598-018-19774-4.
37. Kamaruzaman N.A., Kardia E, Kamaldin N., Latahir A.Z., Yahaya B.H. The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy. *Biomed. Res. Int.* 2013;691830. DOI: 10.1155/2013/691830.
38. Kawano Y., Honda A. Gene Targeting in Rabbits: Single-Step Generation of Knock-out Rabbits by Microinjection of CRISPR/Cas9 Plasmids. *Methods Mol. Biol.* 2017;1630:109–120. DOI: 10.1007/978-1-4939-7128-2_10.
39. 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;533:420–424.
40. Kondo M., Sakai T., Komeima K., Kurimoto Y., Ueno S., Nishizawa Y., et al. Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009;50:1371–1377.
41. Lee J.G., Sung Y.H., Baek I.J. Generation of genetically-engineered animals using engineered endonucleases. *Arch. Pharm. Res.* 2018;41(9):885–897. DOI: 10.1007/s12272-018-1037-z.
42. Lenz W. A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology*. 1988;38:203–215. DOI: 10.1002/tera.1420380303.
43. Li L., Zhang Q., Yang H., Zou Q., Lai C., Jiang F., et al. Fumarylacetoacetate Hydrolase Knock-out Rabbit Model for Hereditary Tyrosinemia Type I. *J. Biol. Chem.* 2017;292(11):4755–4763. DOI: 10.1074/jbc.M116.764787.
44. Li Q., Qin Z., Wang Q., Xu T., Yang Y., He Z. Applications of Genome Editing Technology in Animal Disease Modeling and Gene Therapy. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2019;17:689–698. DOI: 10.1016/j.csbj.2019.05.006.
45. Liu H., Sui T., Liu D., Liu T., Chen M., Deng J., et al. Multiple homologous genes knockout (KO) by CRISPR/Cas9 system in rabbit. *Gene*. 2018;647:261–267. DOI: 10.1016/j.gene.2018.01.044.
46. Liu T., Wang J., Xie X., Wang K., Sui T., Liu D., et al. DMP1 Ablation in the Rabbit Results in Mineralization Defects and Abnormalities in Haversian Canal/Osteon Microarchitecture. *J. Bone Miner. Res.* 2019. DOI: 10.1002/jbmr.3683.
47. Liu Z., Chen M., Chen S., Deng J., Song Y., Lai L., et al. Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit. *Nat. Commun.* 2018;9(1):2717. DOI: 10.1038/s41467-018-05232-2.
48. Liu Z., Chen S., Shan H., Zhang Q., Chen M., Lai L., et al. Efficient and precise base editing in rabbits using human APOBEC3A-nCas9 fusions. *Cell Discov.* 2019;5:31. DOI: 10.1038/s41421-019-0099-5.
49. Lombardi R., Rodriguez G., Chen S.N., Ripplinger C.M., Li W., Chen J., et al. Resolution of established cardiac hypertrophy and fibrosis and prevention of systolic dysfunction in a transgenic rabbit model of human cardiomyopathy through thiol-sensitive mechanisms. *Circulation*. 2009;117:1398–1407.
50. Lozano W.M., Arias-Mutis O.J., Calvo C.J., Chorro F.J., Zarzoso M. Diet-Induced Rabbit Models for the Study of Metabolic Syndrome. *Animals (Basel)*. 2019;9(7). PII: E463. DOI: 10.3390/ani9070463.
51. Lu R., Yuan T., Wang Y., Zhang T., Yuan Y., Wu D., et al. Spontaneous severe hypercholesterolemia and atherosclerosis lesions in rabbits with deficiency of low-density

- lipoprotein receptor (LDLR) on exon 7. *EBioMedicine*. 2018;36:29–38. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.09.020.
52. Lu Y., Liang M., Zhang Q., Liu Z., Song Y., Lai L., et al. Mutations of GADD45G in rabbits cause cleft lip by the disorder of proliferation, apoptosis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2019;1865(9):2356–2367. DOI: 10.1016/j.bbdis.2019.05.015.
53. Lv Q., Yuan L., Deng J., Chen M., Wang Y., Zeng J., et al. Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* 2016;6:25029.
54. Maertens L., Lebas F., Szendrői Zs. Rabbit milk: a review of quantity, quality and non-dietary affecting factors. *World Rabbit Sci.* 2006;14:205–230.
55. Mage R.G., Esteves P., Rader C. Rabbit models of human diseases for diagnostics and therapeutics development. *Dev. Comp. Immunol.* 2019;92:99–104. DOI: 10.1016/j.dci.2018.10.003.
56. Mashiko D., Fujihara Y., Satouh Y., Miyata H., Isotani A., Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci. Rep.* 2013;3:3355.
57. Meier R.P.H., Muller Y.D., Balaphas A., Morel P., Pascual M., Seebach J.D., et al. Xenotransplantation: back to the future? *Transpl. Int.* 2018;31(5):465–477. DOI: 10.1111/tri.13104.
58. Mizuno S., Dinh T.T., Kato K., Mizuno-Iijima S., Tanimoto Y., Daitoku Y., et al. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm. Genome*. 2014;25:327–334.
59. Mohan R.R., Tovey J.C.K., Sharma A., Schultz G.S., Cowden J.W., Tandon A. Targeted Decorin gene therapy delivered with adenoassociated virus effectively retards corneal neovascularization *in vivo*. *PLoS One*. 2011;6(10):e26432.
60. Niimi M., Yang D., Kitajima S., Ning B., Wang C., Li S., et al. ApoE knockout rabbits: A novel model for the study of human hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2016;245:187–193.
61. Oshiro H. The role of the lymphatic system in rabbit models for cancer metastasis research: a perspective from comparative anatomy. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 2014;91(2):25–28.
62. Parvinian A., Casadaban L.C., Gaba R.C. Development, growth, propagation, and angiographic utilization of the rabbit VX2 model of liver cancer: a pictorial primer and “how to” guide. *Diagn. Interv. Radiol.* 2014;20(4):335–340. DOI: 10.5152/dir.2014.13415.
63. Pellerin O., Amara I., Sapoval M., Méachi T., Déan C., Beaune P., et al. Hepatic Intra-arterial Delivery of a “Trojan-horses” Gene Therapy: A Pilot Study on Rabbit VX2 Hepatic Tumor Model. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 2018;41(1):153–162. DOI: 10.1007/s00270-017-1833-8.
64. Peng X. Transgenic rabbit models for studying human cardiovascular diseases. *Comp. Med.* 2012;62(6):472–479.
65. Peng X., Knouse J.A., Hernon K.M. Rabbit Models for Studying Human Infectious Diseases. *Comp. Med.* 2015;65(6):499–507.
66. Permy M., López-Peña M., Muñoz F., González-Cantalapiedra A. Rabbit as model for osteoporosis research. *J. Bone Miner. Metab.* 2019;37(4):573–583. DOI: 10.1007/s00774-019-01007-x.
67. Prieto V., Ludwig J.M., Farris A.B., Nagaraju G.P., Lawal T.O., El-Rayes B., et al. Establishment of human metastatic colorectal cancer model in rabbit liver: A pilot study. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177212. DOI: 10.1371/journal.pone.0177212.
68. Song J., Wang G., Hoenerhoff M.J., Ruan J., Yang D., Zhang J., et al. Bacterial and Pneumocystis Infections in the Lungs of Gene-Knockout Rabbits with Severe Combined Immunodeficiency. *Front. Immunol.* 2018;9:429. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00429.
69. Song J., Yang D., Ruan J., Zhang J., Chen Y.E., Xu J. Production of immunodeficient rabbits by multiplex embryo transfer and multiplex gene targeting. *Sci Rep.* 2017;7(1):12202. DOI: 10.1038/s41598-017-12201-0.
70. Song J., Yang D., Xu J., Zhu T., Chen Y.E., Zhang J. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat. Commun.* 2016;7:10548.
71. Song J., Zhong J., Guo X., Chen Y., Zou Q., Huang J., et al. Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs. *Cell Res.* 2013;23:1059–1062.
72. Song Y., Liu T., Wang Y., Deng J., Chen M., Yuan L., et al. Mutation of the Sp1 binding site in the 5' flanking region of SRY causes sex reversal in rabbits. *Oncotarget*. 2017;8(24):38176–38183. DOI: 10.18632/oncotarget.16979.
73. Song Y., Xu Y., Deng J., Chen M., Lu Y., Wang Y., et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation of tyrosinase (Tyr) 3' UTR induce graying in rabbit. *Sci. Rep.* 2017;7(1):1569. DOI: 10.1038/s41598-017-01727-y.
74. Song Y., Xu Y., Liang M., Zhang Y., Chen M., Deng J., et al. CRISPR/Cas9-mediated mosaic mutation of SRY gene induces hermaphroditism in rabbits. *Biosci. Rep.* 2018;38(2). PII: BSR20171490. DOI: 10.1042/BSR20171490.
75. Song Y., Yuan L., Wang Y., Chen M., Deng J., Lv Q., et al. Efficient dual sgRNA-directed large gene deletion in rabbit with CRISPR/Cas9 system. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016;73:2959–2968. DOI: 10.1007/s00018-016-2143-z.
76. Song Y., Zhang Y., Chen M., Deng J., Sui T., Lai L., et al. Functional validation of the albinism-associated tyrosinase T373K SNP by CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair (HDR) in rabbits. *EBioMedicine*. 2018;36:517–525. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.09.041.
77. Sui T., Lau Y.S., Liu D., Liu T., Xu L., Gao Y., et al. A novel rabbit model of Duchenne muscular dystrophy generated by CRISPR/Cas9. *Dis. Model. Mech.* 2018;11(6). PII: dmm.032201. DOI: 10.1242/dmm.032201.

78. Sui T., Liu D., Liu T., Deng J., Chen M., Xu Y., et al. LMNA-mutated Rabbits: A Model of Premature Aging Syndrome with Muscular Dystrophy and Dilated Cardiomyopathy. *Aging Dis.* 2019;10(1):102–115. DOI: 10.14336/AD.2018.0209.
79. Sui T., Xu L., Lau Y.S., Liu D., Liu T., Gao Y., et al. Development of muscular dystrophy in a CRISPR-engineered mutant rabbit model with frame-disrupting ANO5 mutations. *Cell. Death. Dis.* 2018;9(6):609. DOI: 10.1038/s41419-018-0674-y.
80. Sui T., Yuan L., Liu H., Chen M., Deng J., Wang Y., et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation of PHEX in rabbit recapitulates human X-linked hypophosphatemia (XLH). *Hum. Mol. Genet.* 2016;25:2661–2671.
81. Taniyama Y., Morishita R., Aoki M., Nakagami H., Yamamoto K., Yamazaki K., et al. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hind limb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther.* 2001;8:181–189.
82. Thomas P.B., Samant D.M., Selvam S., Wei R.H., Wang Y., Stevenson D., et al. Adenoassociated virus-mediated il-10 gene transfer suppresses lacrimal gland immunopathology in a rabbit model of autoimmune dacryoadenitis. *IOVS.* 2010;51:5137–5144.
83. Tsurumi Y., Takeshita S., Chen D., Kearney M., Rossow S.T., Passeri J., et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation.* 1996;94(12):3281–3290.
84. Volobueva A.S., Orekhov A.N., Deykin A.V. An update on the tools for creating transgenic animal models of human diseases — focus on atherosclerosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2019;52(5):e8108. DOI: 10.1590/1414-431X20198108.
85. Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013;153(4):910–918. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
86. Wang Y., Fan N., Song J., Zhong J., Guo X., Tian W., et al. Generation of knockout rabbits using transcription activator-like effector nucleases. *Cell. Regen. (Lond).* 2014;3:3. DOI: 10.1186/2045-9769-3-3.
87. Waugh J.M., Kattash M., Li J., Yuksel E., Kuo M.D., Lussier M., et al. Gene therapy to promote thromboresistance: Local overexpression of tissue plasminogen activator to prevent arterial thrombosis in an *in vivo* rabbit model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96(3):1065–1070.
88. Weber J., Peng H., Rader C. From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies. *Exp. Mol. Med.* 2017;49(3):e305. DOI: 10.1038/emm.2017.23.
89. Xu Y., Wang Y., Song Y., Deng J., Chen M., Ouyang H., et al. Generation and Phenotype Identification of PAX4 Gene Knockout Rabbit by CRISPR/Cas9 System. *G3 (Bethesda).* 2018;8(8):2833–2840. DOI: 10.1534/g3.118.300448.
90. Yan Q., Zhang Q., Yang H., Zou Q., Tang C., Fan N., et al. Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell. Regen. (Lond).* 2014;3(1):12. DOI: 10.1186/2045-9769-3-12.
91. Yang D., Song J., Zhang J., Xu J., Zhu T., Wang Z., et al. Identification and characterization of rabbit ROSA26 for gene knock-in and stable reporter gene expression. *Sci. Rep.* 2016;6:25161.
92. Yang D., Xu J., Zhu T., Fan J., Lai L., Zhang J., et al. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases. *J. Mol. Cell. Biol.* 2014;6(1):97–99. DOI: 10.1093/jmcb/mjt047.
93. Yang D., Zhang J., Xu J., Zhu T., Fan Y., Fan J., et al. Production of apolipoprotein C-III knockout rabbits using zinc finger nucleases. *J. Vis. Exp.* 2013;(81):e50957. DOI: 10.3791/50957.
94. Yin M., Jiang W., Fang Z., Kong P., Xing F., Li Y., et al. Generation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene knockout rabbits by homologous recombination and gene trapping through somatic cell nuclear transfer. *Sci. Rep.* 2015;5:16023.
95. Yoshimi K., Kaneko T., Voigt B., Mashimo T. Allelespecific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nat. Commun.* 2014;5:4240.
96. Yuan L., Sui T., Chen M., Deng J., Huang Y., Zeng J., et al. CRISPR/Cas9-mediated GJA8 knockout in rabbits recapitulates human congenital cataracts. *Sci. Rep.* 2016;6:22024.
97. Yuan L., Yao H., Xu Y., Chen M., Deng J., Song Y., et al. CRISPR/Cas9-Mediated Mutation of α A-Crystallin Gene Induces Congenital Cataracts in Rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017;58(6):BIO34–BIO41. DOI: 10.1167/iovs.16-21287.
98. Yuan T., Zhong Y., Wang Y., Zhang T., Lu R., Zhou M., et al. Generation of hyperlipidemic rabbit models using multiple sgRNAs targeted CRISPR/Cas9 gene editing system. *Lipids Health Dis.* 2019;18(1):69. DOI: 10.1186/s12944-019-1013-8.
99. Zakhartchenko V., Flisikowska T., Li S., Richter T., Wieland H., Durkovic M., et al. Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals. *Biol. Reprod.* 2011;84:229–237.
100. Zernii E.Y., Baksheeva V.E., Iomdina E.N., Averina O.A., Permyakov S.E., Philippov P.P., et al. Rabbit Models of Ocular Diseases: New Relevance for Classical Approaches. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2016;15(3):267–291.
101. Zhang J., Niimi M., Yang D., Liang J., Xu J., Kimura T., et al. Deficiency of Cholesteryl Ester Transfer Protein Protects Against Atherosclerosis in Rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017;37(6):1068–1075. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309114.
102. <https://medach.pro/post/2059>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

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

Петрова Наталья Владимировна*, ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Максименко Сергей Васильевич, к.б.н., ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: vx136@rambler.ru

Матвеевко Елена Леонидовна, к.э.н., доц., ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: matveenkoel@mail.ru

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

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

Vadim A. Yezersky, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — branch of the Federal Scientific Center of Animal Husbandry — The All-Russian Institute of Animal Husbandry named after academician L.K. Ernst;
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

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

Sergey V. Maksimenko, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: vx136@rambler.ru

Elena L. Matveyenko, Cand. Sci. (Econ.), Assoc. Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: matveenkoel@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ЛИПОСОМИРОВАННАЯ ФОРМА ЭКСТРАКТА ПРЕПУЦИАЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАБАРГИ — НОВОЕ СРЕДСТВО АДАПТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

В.Н. Каркищенко, М.С. Дуля*, 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

Впервые получена и охарактеризована липосомальная форма нового оригинального средства на основе препуциальной железы мускуса кабарги сибирской. Для препаративного выделения липосом мускуса кабарги использован эффективный и масштабируемый метод гомогенизации при высоком давлении. Полученный липосомальный продукт охарактеризован методами динамического светорассеяния, просвечивающей микроскопии, препаративной и аналитической хроматографии, хромато-масс-спектрометрии на показатели качества распределения по размерам, гомогенность и степень включения биологически активных компонентов. Получены гомогенные дисперсии липосом мускуса кабарги с равномерным распределением по размерам — с максимумами распределения при 50 и 240 нм. Установлена высокая физико-химическая стабильность липосомальной дисперсии: ζ -потенциал полученных наночастиц составил $-35...-47$ мВ. Степень включения в липосомы целевых компонентов мускуса кабарги по данным гель-размерной хроматографии и масс-спектрометрии для липосом мускуса по стероидам и общему белку составила 55–75%. Полученные показатели качества формируют предпосылки к высокой эффективности средства на основе липосомальной формы экстрактов мускуса кабарги как адаптогена природного происхождения с усиленным и выраженным действием.

Ключевые слова: кабарга, мускус, железа, липосомы, хроматография, масс-спектрометрия, адаптогены, пептиды, белки, андростероиды

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л., Каркищенко Н.Н. Липосомированная форма экстракта препуциальной железы кабарги — новое средство адаптогенного действия. *Биомедицина*. 2019;15(4):34–45. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-34-45>

Поступила 02.09.2019

Принята после доработки 31.10.2019

Опубликована 10.12.2019

A LIPOSOMAL COMPOSITION OF MUSC DEER PREPUTIAL GLAND EXTRACT AS A NEW AGENT OF ADAPTOGENIC ACTION

Vladislav N. Karkischenko, Maxim S. Dulya*, 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, Svetlye gory village, building 1

For the first time, a liposomal form of a new original drug based on the Siberian musk deer preputial gland extract was obtained and characterized. An effective and scalable method of high-pressure homogenization was used for preparative extraction of liposomes from musk extracts. For the obtained liposomal product,

such indicators as the quality of size distribution, homogeneity and the degree of inclusion of biologically active components were characterized using the methods of dynamic light scattering, transmission microscopy, preparative and analytical chromatography and chromatography-mass spectrometry. A homogeneous dispersion of musk liposomes with a uniform size distribution was obtained, with the maximum distribution values being achieved at 50 and 240 nm. The ζ -potential of the obtained nanoparticles of $-35...-47$ mV confirmed a high physicochemical stability of the developed liposomal dispersion. According to the gel filtration chromatography and mass spectrometry results, the degree of inclusion of the target musk extract components in the liposomes was 55–75% in terms of steroid and total protein values. The obtained quality indicators indicate that the developed liposomal composition of musk deer extracts can be used as a high-effective natural adaptogen.

Keywords: musk deer, musk, gland, liposomes, chromatography, mass spectrometry, adaptogens, peptides, proteins, androsteroids

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

For citation: Karkischenko V.N., Dulya M.S., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L., Karkischenko N.N. A Liposomal Composition of Musk Deer Preputial Gland Extract as a New Agent of Adaptogenic Action. *Journal Biomed.* 2019;15(4):34–45. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-34-45>

Submitted 02.09.2019

Revised 31.10.2019

Published 10.12.2019

Введение

Адаптогены

Одним из ключевых понятий, отражающих особенности существования живого организма в изменяющихся условиях среды, является адаптация. Под адаптацией понимают системный ответ организма на длительное или многократное воздействие окружающей среды, обеспечивающий выполнение основных задач деятельности и направленный на достижение адекватности первичной реакции и минимизацию побочных реакций. Такой ответ связан с изменением структуры гомеостатического регулирования, направленным на оптимизацию регуляторных, энергетических и пластических процессов в организме [5].

Фармакология адаптационных процессов — одно из ключевых направлений «фармакологии здорового человека», являющихся связующим звеном физиологии и биохимии адаптации, медицины экстремальных состояний, спортивной и военной медицины, производственной медицины, экологической медицины, иммунофармакологии, нейрофармакологии, эндокринологии, а также фитохимии и фармакогнозии.

К настоящему времени предложено значительное количество средств, способных ускорять процессы адаптации, стимулировать защитные силы организма, повышать его работоспособность и резистентность в ходе приспособления к неблагоприятным эколого-профессиональным факторам. Препараты, обладающие такими свойствами, называются адаптогенами [2, 4, 5]. Эти вещества с большим успехом применяются для повышения физической выносливости и умственной работоспособности. Адаптогены все более широко применяются в клинической практике при комплексном лечении ослабленных больных, в процессе медицинской реабилитации.

В настоящее время имеется достаточно большой материал, свидетельствующий об их положительном действии на здоровых людей, выполняющих тяжелую физическую и умственную работу (в т.ч. и в условиях Крайнего Севера и др. тяжелых климатических условиях), на спортсменов, на лиц, ослабленных различными заболеваниями и вредными воздействиями. Общим эффектом для всех адаптоге-

нов является неспецифическое повышение функциональных возможностей (состояние повышенной неспецифической резистентности), повышение приспособляемости (адаптации) организма при осложненных условиях существования.

Адаптогены практически не меняют нормальных функций организма, но значительно повышают физическую и умственную работоспособность, переносимость нагрузок, устойчивость к различным неблагоприятным факторам и сокращают сроки адаптации к ним. Под действием адаптогенов мышечная работа характеризуется более экономичным расходом энергетических ресурсов организма, усиливаются окислительные процессы, связанные с фосфорилированием, улучшается энергетический обмен, по-видимому, за счет усиления аэробных реакций и использования в качестве источника энергии не только углеводов, но и липидов [1].

Действие адаптогена должно быть неспецифично и универсально, т. е. под его влиянием должна повышаться устойчивость к действию основных природных (физическая нагрузка, гипоксия, холод и т. д.) и техногенных (кинетозы, вибрации) экстремальных факторов. Положительные эффекты при его применении должны осуществляться за счет оптимизации обменных процессов, защиты тканевых структур от деструкции. Повторные введения адаптогена приводят к формированию «системно-структурного следа адаптации» [2].

По своему происхождению адаптогены могут быть разделены на две группы: природные и синтетические. Источниками природных адаптогенов являются наземные и водные растения, животные и микроорганизмы. К преимуществам природных адаптогенов относятся их малая токсичность, широта терапевтического действия, отсутствие фазы отрицательного последствия и привыкания вследствие длительного применения. Препараты

животного происхождения: пантокрин, рантарин, пантогематоген (экстракт из неокостенелых рогов марала, изюбря или пятнистого оленя), рог носорога (при истощении и импотенции, как антиоксидантическое и жаропонижающее средство), порошок из костей тигров и медведя, свежая и консервированная кровь и мышцы змей (особенно японского ужа), кожа и мясо ежа, экстракт из свежих улиток, порошок из сушеных сверчков, раковины жемчужницы, пауки и скорпионы (как успокаивающее, наркотическое и антиоксидантическое средство), червяки, пиявки, продукты пчеловодства (перга, цветочная пыльца, маточное молочко, комбинированные препараты из женьшеня и маточного молочка пчел), сотовый мёд из рамок многолетней экспозиции, мёд с препаратами адаптогенов (женьшенем, родиолой розовой, левзеей и др.), препараты из морских и океанических животных (морских львов и др. млекопитающих, морских черепаха), моллюсков и иглокожих (кукумарий, мидий, морского гребешка) и др.

Экстракт преуциальной железы кабарги — природный адаптоген

Кабарга (*Moschus moschiferus*) — небольшое, похожее на оленя животное, населяющее крутые, поросшие хвойным лесом скалистые склоны гор. Кабарга характеризуется стенофагией (узкоспециализированное питание животных) и преобладанием в ее рационе лишайников, доля которых очень высока и может достигать 95%. Мускус (выделение особой железы) кабарги является одним из наиболее ценных природных биостимуляторов, применение которых в арабской, тибетской, китайской и индийской медицине известно с середины IV века. Он применяется или как монокомпонентная зернистая субстанция, или как обязательный базисный компонент различных комплексов поддержания жизнедеятельности и долголетия.

Экспериментальные и клинические наблюдения на мышах, крысах, морских свинках и кроликах показали, что мускус в дозах 1–100 мг/кг массы оказывает анальгезирующее и противовоспалительное влияние, вызывает спонтанные сокращения матки у крыс, тормозит перистальтику изолированной подвздошной кишки у кролика [4].

В экспериментальных исследованиях обнаружены антиоксидантные свойства мускуса кабарги [7]. Антиоксидантные свойства мускуса предполагают эффективное его применение в профилактике и лечении заболеваний, причиной которых является оксидативный стресс или в патогенезе которых он участвует. Перспективность для современной медицины новых биогенных стимуляторов, полученных из мускуса кабарги, основанная на многовековом опыте их применения в арабской, тибетской, китайской и индийской медицине, не вызывает сомнений [9].

Установлено, что отличительными особенностями состава мускусовой железы кабарги являются наличие широкого ряда андростероидов, жирных ненасыщенных и насыщенных кислот (и их эфиров), кетонов и альдегидов (мусконподобные производные, придающие мускусовой железе специфический запах), ароматических производных и гетероциклического класса соединений (пиримидины, фураны) [4]. Согласно установленному составу мускуса кабарги нами предложено выделить 3 группы соединений, значимых с точки зрения биологического эффекта и его выраженности: 1) стероидные компоненты; 2) жирные кислоты; 3) пептиды и белки. Широкий спектр показаний к применению мускуса кабарги является следствием многокомпонентного состава ткани, в которой особое внимание вызывают регуляторные соединения пептидной природы, гормонально активные комплексы и ростовые факторы, в т. ч. активирующие жизненный цикл стволовых клеток [8].

Использование липосомальных форм гормональных препаратов позволяет уменьшить проявление побочных эффектов, повысить терапевтическую эффективность и уменьшить используемую дозу гормона. В настоящее время разработаны различные формы липосом гормональных препаратов: инъекционные, аэрозольные и мазевые.

Липосомирование биологически активных компонентов мускуса кабарги

Липосомы представляют собой коллоидные образования, состоящие из небольшого объема водной фазы, отделенной от объема раствора замкнутым липидным бислоем. Многие фосфолипиды при диспергировании в воде самопроизвольно образуют гетерогенную смесь везикулярных структур, состоящих из нескольких бислоевых концентрических оболочек. Такие липосомы называются мультиламеллярными везикулами. Большой интерес представляют моноламеллярные везикулы, т. е. везикулы, образованные одинарным бислоем. При получении липосом возможно контролировать их внутреннее содержимое, состав бислоя и его кривизну (размер липосом).

Состав липосом (соотношение компонентов) определяет характер и свойства биологического действия липосомального препарата. Основным компонентом липосом являются фосфолипиды (ФЛ). ФЛ относятся к классу полярных липидов и представляют собой сложные эфиры жирных кислот и глицерола. Уникальное строение природных ФЛ, в молекулах которых одновременно находятся гидрофобные и полярные фрагменты, предопределяет их незаменимую роль во многих важнейших биологических процессах.

ФЛ являются одними из основных компонентов биомембран эукариотических и прокариотических клеток, среди них есть биологически активные вещества, которые

используются в пищевой и фармацевтической промышленности. Широкое использование липидов в медицине основано на их высокой функциональной активности, малой токсичности, биосовместимости и биодegradуемости. ФЛ для медицинских целей производятся в основном из желтков куриных яиц или соевых бобов, в небольших количествах используется также другое растительное сырье и ткани животных. Наиболее частое применение нашел фосфатидилхолин, получаемый из природного сырья.

Липосомы рассматриваются как эффективные средства доставки к органам-мишеням лекарственных средств и широко применяются в клинической практике [3]. Благодаря особенностям транспорта, транслокации через гистогематические барьеры и клеточные мембраны, метаболитической трансформации липосомальные препараты обладают уникальными свойствами [6]. Применение липосом как средств доставки позволяет в некоторых случаях существенно увеличить биодоступность, в других — напротив, предотвратить чрезмерное увеличение концентрации препарата в крови, тем самым снижая опасность передозировки и уменьшая побочные эффекты. На сегодняшний день наиболее значимым способом оценки эффективности новых липосомальных лекарственных форм является существующий арсенал различных современных методов оценки биодоступности веществ (хроматография, масс-спектрометрия).

Особую роль липосомы стали играть в связи с появлением препаратов, получаемых методами биотехнологии, таких как белковые и пептидные препараты, а также лекарственные средства на основе нуклеиновых кислот.

Цель работы — препаративное получение и характеристика липосомальной формы экстракта репуциальной железы кабарги сибирской.

Материалы и методы

Выбор метода получения липосом определяется необходимостью максимального сохранения в них биологической активности выделяемых компонентов, регулированием заданного размера липосом, скоростью и производительностью процесса гомогенизации, а также возможностью масштабирования технологии.

Диспергирование реакционной смеси выполняли на гомогенизаторе высокого давления «Донор» (Россия).

Полученные р-ры липосом мускуса кабарги измерялись на корреляционном спектрометре Photocor Compact-Z с использованием программного обеспечения Photocor Software.

Микроскопическое исследование выполнялось для образца липосом мускуса кабарги с помощью просвечивающего электронного микроскопа LEO-912 AB Omega.

Молекулярно-массовое распределение липосомальных продуктов оценивали на жидкостном изократическом хроматографе среднего давления NGC Discovery (Bio-Rad, США), оснащенный многоволновым спектрофотометрическим детектором, датчиком pH элюента, кондуктометрической ячейкой и хроматографической колонкой для гель-размерной хроматографии (ГРХ) высокого разрешения Enrich SEC 650, в качестве калибровочных стандартов с известными молекулярными массами использовали Gel Filtration Standard (Bio-Rad, США). Условия ГРХ-анализа: 0,1 М Трис-НСl; 0,1 М NaCl pH=7,4.

Степень включения биологически активных компонентов мускуса кабарги в состав липосом определяли методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения ВЭЖХ-МС ВР 1290 QTOF 6545XT (Agilent Technologies, США) для фракций, собранных после гель-размерной хроматографии, позволяющей отделить липосомы от низкомолекулярной не включаемой доли субстанции липосом мускуса кабарги и фос-

фатидилхолиновой части. Маркерными компонентами включения выбраны стероидная фракция, холестерин и общий белок.

Готовую липосомальную форму мускуса кабарги получали лиофилизацией в оптимизированных условиях высушивания на лиофильной станции Alpha 2-4 LSCplus Lyocube Freeze Dryer (Martin Christ, Германия).

Реагенты и реактивы. В работе использовались следующие реактивы и материалы: спирт этиловый, ортофосфорная кислота, натрия хлорид, натриевая соль дезоксиголевой кислоты, трис(гидрохсиметил)-аминометан, ацетонитрил (для ВЭЖХ-МС), соевый лецитин, экстракт мускусовой железы кабарги, буфер для гомогенизации, лактоза, криопротектор, буферы для хроматографии и масс-спектрометрии.

Из существующих на сегодняшний день промышленных методов получения липосом наиболее предпочтительным является метод гомогенизации под высоким давлением.

Диспергируемые компоненты приготавливаемого продукта после предварительного перемешивания в механическом смесителе, в нашем случае — в суперблендере, переносятся в расходную ёмкость. При продавливании через микрощель процессы диспергирования, гомогенизации и дезинтеграции осуществляли за счет резкого падения давления и действия гидродинамических сил турбулентного потока, возникающих в области микрощели. Микрокапли с включаемыми компонентами мускуса кабарги, испытывая усилия растягивания и среза, дробятся и диспергируются на части. Величина давления характеризует степень этих усилий и служит основным технологическим показателем трудоемкости процесса.

После продавливания через микрощель продукт поступает либо в приёмную ёмкость, если процесс закончен, либо вновь в расходную ёмкость для повторного про-

давливания через микрощель. Процесс повторяется несколько раз до достижения необходимого качества продукта.

Контроль за процессом проводили при помощи измерения средней величины размеров полученных после диспергирования частиц и величины ζ -потенциала. Если достичь нужного среднего размера частиц при установленном давлении не удаётся, то давление гомогенизации повышается. Процесс гомогенизации необходимо проводить до получения устойчивой суспензии, которая характеризуется высокой агрегативной (конденсационной) и седиментационной стабильностью.

Важность ζ -потенциала состоит в том, что его значение связано с устойчивостью коллоидных дисперсий. ζ -потенциал определяет степень и характер взаимодействия между частицами дисперсной системы. Для молекул и частиц, которые достаточно малы, высокий ζ -потенциал будет означать стабильность, т. е. раствор или дисперсия будут устойчивы по отношению к агрегации. Когда ζ -потенциал низкий, притяжение превышает отталкивание, и устойчивость дисперсии будет нарушаться. Так, коллоиды с высоким ζ -потенциалом являются электрически стабилизированными, в то время как коллоиды с низким ζ -потенциалом склонны коагулировать или флокулировать.

Значение ζ -потенциала, равное 30 мВ (положительное или отрицательное), нами рассматривается как характерное значение для условного разделения низкозаряженных и высокозаряженных поверхностей. Чем больше электрокинетический потенциал, тем устойчивее коллоид.

Для получения липосом методом гомогенизации высоким давлением 100 мл реакционной среды (в различных соотношениях мускуса кабарги и лецитина) пропускали через гомогенизатор 3 раза при рабочем давлении 1000 атм до получения монодисперсного опалесцирующего р-ра.

Анализ размерных эффектов полученных липосом. Для определения размера наночастиц и величины ζ -потенциала использовался метод лазерной корреляционной спектроскопии, или метод динамического рассеяния света (ДРС). Он широко используется при исследованиях молекулярных растворов. Измерения проводились на спектрометре Photocog Compact-Z.

Спектрометром измерялись радиусы частиц в 11-ти растворах. Проводилось по четыре измерения каждого раствора. Обработка производилась программным обеспечением DynaLS: каналы коррелятора с 30 по 150, границы поиска решения от 0,01 до 10 000 нм.

Среднее арифметическое значение размера липосом мускуса кабарги для двух независимых измерений составило 50 и 240 нм (рис. 1).

Микрофотографии липосом мускуса кабарги приведены на рис. 2.

Данные рис. 2А коррелируют с получаемыми значениями распределения по размерам методом динамического светорассеяния (50 ± 10 нм).

Микрофотография липосом мускуса кабарги после 5-ти циклов гомогенизации высоким давлением (до 160 МПа) представлена на рис. 2Б. Видны более гомогенные

и однородные по размеру липосомы, без агрегирования и конгломерации. Данные коррелируют с получаемыми значениями распределения по размерам методом динамического светорассеяния (243 ± 10 нм).

Хроматограмма раствора липосом мускуса кабарги и соответствующий им масс-спектр представлены на рис. 3.

Каждая из собираемых фракций после гель-размерной хроматографии подвергалась ВЭЖХ-МС ВР на содержание включаемого компонента липосом мускуса кабарги в состав липосом (рис. 4).

На этапе выбора оптимального режима хроматографического разделения компонентов фосфатидилхолина от включаемого компонента липосом мускуса кабарги использовали набор фаз для ВЭЖХ-разделения (С18, С8, SEC и PLRP).

Анализ восстановленных липосом после лиофилизации проводили на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1260 Infinity II с использованием хроматографической колонки Yagta SEC-2000; 4,6×300 mm; 5 μ m; Phenomenex.

Элюирование осуществляли смесью, состоящей из компонентов 5% В, в изократическом режиме: до 30 мин — 5% В.

Время уравнивания колонки на исходных условиях — 2 мин. Компонент

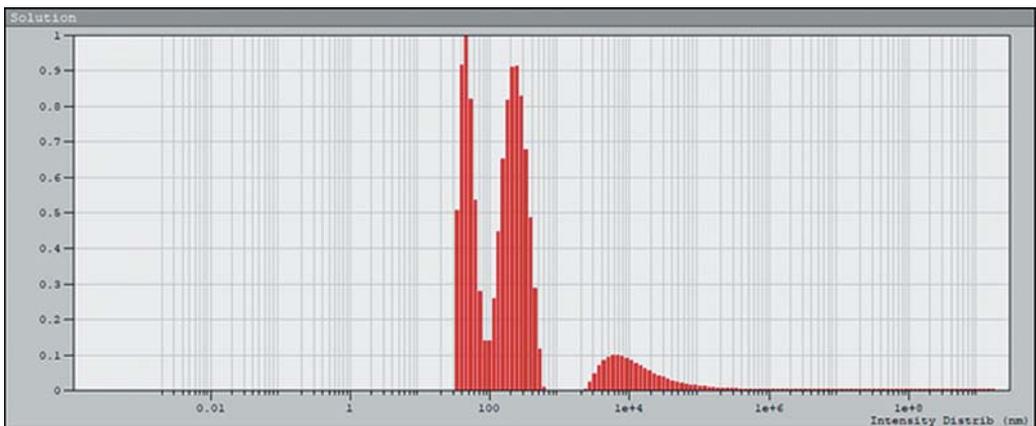


Рис. 1. Гистограмма распределения по размерам частиц липосом мускуса кабарги.
Fig. 1. Histogram of the particle size distribution of musk deer liposomes.

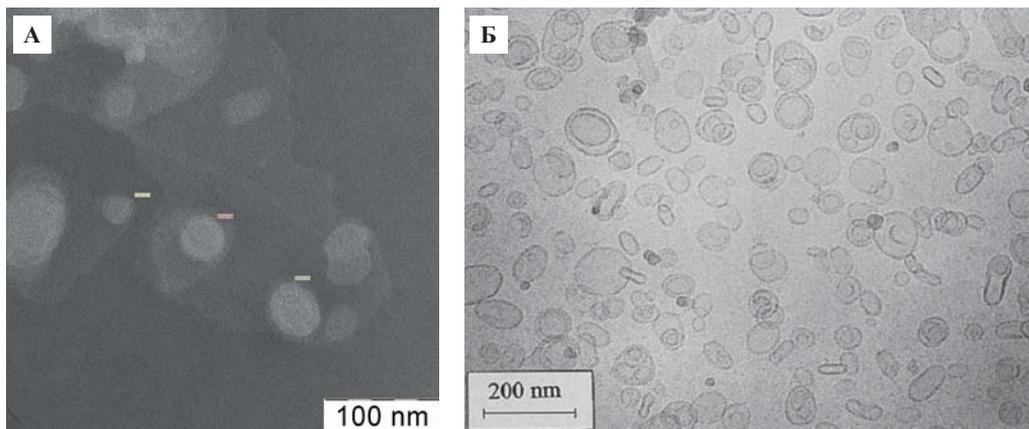


Рис. 2. Микрофотографии липосом мускуса кабарги.
 Fig. 2. Microphotographs of musk deer liposomes.

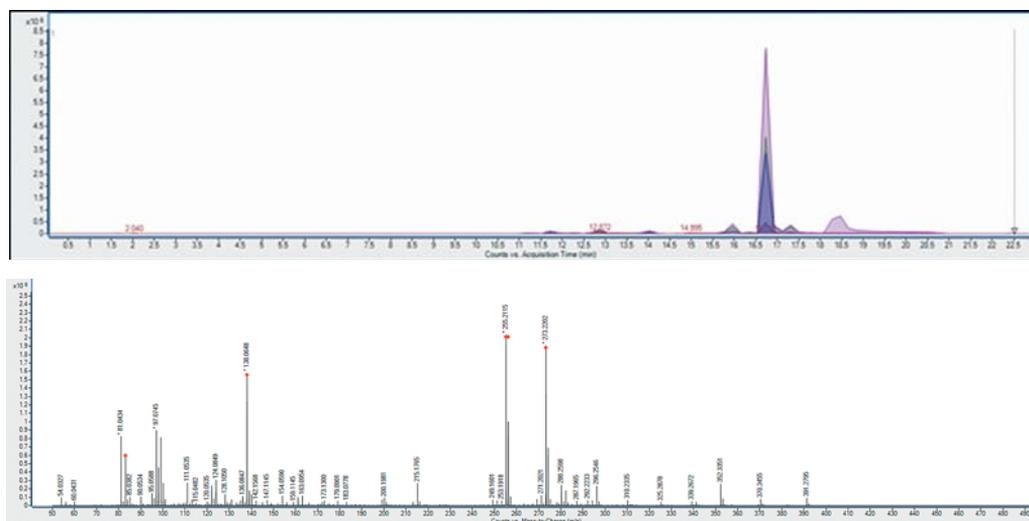


Рис. 3. Хроматограмма полного ионного тока (TIC) (сверху) и масс-спектр высокого разрешения экстракта липосом мускуса кабарги (0,1 мг/мл, хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse XDB-C18; 2,1×100 мм; 1,8 μm).
 Fig. 3. Chromatogram of the total ion current (TIC) (top) and a high-resolution mass spectrum (HR-MS) of the developed musk liposome extract (0.1 mg/ml, ZORBAX Eclipse XDB-C18 column, 2.1×100 mm, 1.8 μm).

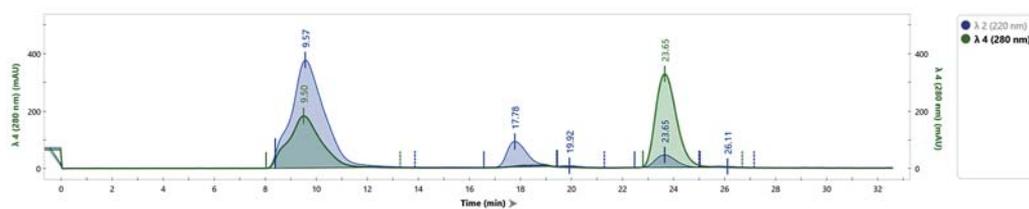


Рис. 4. Препаративная гель-размерная хроматограмма раствора липосом мускуса кабарги (хроматографическая колонка Enrich SEC 650; 4,6×300 мм, 10 μm).
 Fig. 4. Preparative size exclusion chromatography of musk liposomes in aqueous solution (Enrich SEC 650 column, 4.6×300 mm, 10 μm).

А представлял собой 0,1%-й р-р муравьиной кислоты в деионизированной воде, компонент В — 0,1%-й р-р муравьиной кислоты и 10%-й деионизированной воды в ацетонитриле. Скорость потока — 200 мкл/мин, время анализа составило 30 мин.

Степень включения для липосом мускуса кабарги составила 55–70%. ζ -потенциал для полученных липосом имеет значения $-35...-47$ мВ, что свидетельствует о стабильности полученной липосомальной формы мускуса кабарги.

Результаты и их обсуждение

Оценку степени включения липосом мускуса кабарги проводили двумя методически независимыми способами: 1) по данным гель-размерной хроматографии; 2) по данным ВЭЖХ-МС ВР анализа.

Данные гель-размерной хроматографии информативны и свидетельствуют о липосомировании (образовании мицелл и липосом) гомогенизацией при высоком давлении (рис. 6, 7).

Данные относительных вкладов каждой из собираемых фракций ГРХ позволяют сопоставить доли получаемых липосом и оценить степень включения компонентов в состав липосом мускуса кабарги, исходя из понимания, что целевой фракцией, содержащей липосомы с включенными биологически активными компонентами (стероиды, пептиды и белки), являются фракции А1–А2, соответствующие цельным загруженным липосомальным частицам с высоким ζ -потенциалом стабильности и установленного размера. При этом липосомированная форма в условиях гель-размерной хроматографии разделяется от низкомолекулярной невключаемой фракции и элюируется в начальном объеме колонки.

Выводы

1. Формирование липосом мускуса кабарги в условиях гомогенизации при высоком давлении происходит в широком диапазо-

не изучаемых соотношений лецитин : экстракт мускуса кабарги.

2. Получены гомогенные дисперсии липосом мускуса кабарги с равномерным распределением по размерам (по данным динамического светорассеяния и микроскопии, 5 циклов циркуляции, 16 МПа), при этом для липосом достигнут наноразмерный эффект — 50 и 240 нм.

3. Значения ζ -потенциала полученных наночастиц составили $-35...-47$ мВ и отражают высокую стабильность полученных липосом.

4. Степень включения в липосомы целевых компонентов мускуса кабарги по данным гель-размерной хроматографии и масс-спектрометрии для *липосом мускуса кабарги* по стероидам и общему белку составила 55–75%, что свидетельствует о *высоком сродстве биологически активных компонентов препуциальной железы к фосфотидилхолину (лецитину)*, используемому в технологическом цикле получения липосом.

5. Для липосомальной формы экстракта мускуса кабарги успешно оптимизированы условия лиофильного высушивания и получены опытные серии порошка-лиофилизата для дальнейших исследований особенностей биологического действия и параметров фармакокинетики тестируемых липосом.

6. Преимуществами получения липосомальной формы методом гомогенизации высокого давления являются стандартность и возможность масштабирования, высокая производительность метода, минимальное окисление и гидролиз фосфолипидов, сохранность и стабильность липосомального средства, а также возможность постоянного контроля температуры и давления в процессе технологии. Режим гомогенизации позволяет получить липосомальное средство стандартного состава, основная масса которых представлена частицами размерами в диапазоне 50–250 нм.

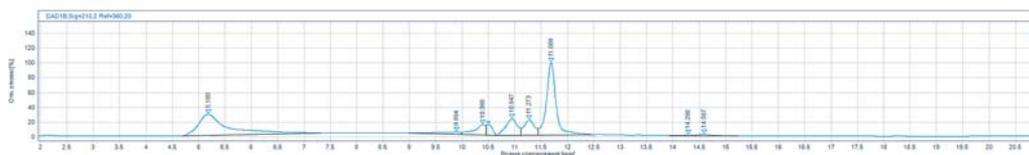


Рис. 5. Аналитическая гель-размерная хроматограмма раствора липосом мускуса кабарги (хроматографическая колонка Yarra SEC-2000; 4,6×300 мм; 5 μm).

Fig. 5. Analytical size exclusion chromatography of musk liposomes in aqueous solution (Yarra SEC-2000 column, 4.6×300 mm, 5 μm).

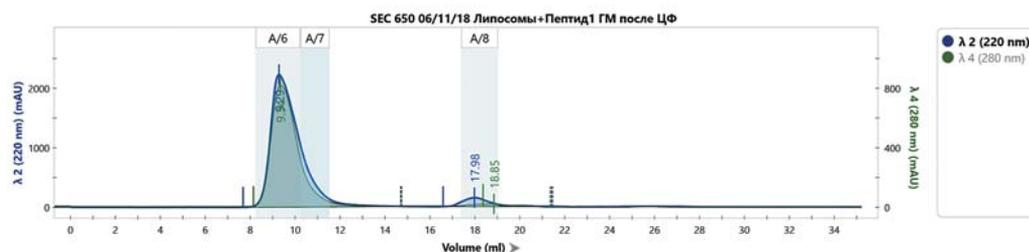


Рис. 6. Гель-размерная хроматограмма липосом мускуса кабарги (хроматографическая колонка Enrich SEC 650; 4,6×300 мм; 10 μm).

Примечание: A6, A7 — фракции целевых липосом мускуса кабарги; A8 — фракция невключённых компонентов в состав липосом мускуса кабарги.

Fig. 6. Size exclusion chromatography of musk liposomes (Enrich SEC 650 column, 4.6×300 mm, 10 μm).

Note: A6, A7 — fraction of target musk liposomes; A8 — fraction of the components that were not included in the final composition.



Рис. 7. Гель-размерная хроматограмма восстановленных после лиофильной сушки липосом мускуса кабарги (хроматографическая колонка Enrich SEC 650; 4,6×300 мм, 10 μm).

Примечание: A1, A2 — фракции липосом; A3 — фракция невключённых в липосомы компонентов мускуса кабарги; A4 — фракция низкомолекулярных фрагментов деградации липосом.

Fig. 7. Size exclusion chromatography of musk liposomes restored after freeze-drying (Enrich SEC 650 column, 4.6×300 mm, 10 μm).

Note: A1, A2 (first peak) — fraction of the liposomes; A3 (second peak) — fraction of the musk extract components that was not included in the composition; A4 (third peak) — fraction of low-molecular weight fragments of liposome destruction.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Виноградов В.М., Бобков Ю.Г. *Фармакологическая стратегия адаптации. Фармакологическая регуляция состояний дезадаптации.* М.: Б.И., 1986. С. 3–11. [Vinogradov V.M., Bobkov Yu.G. *Farmakologicheskaya strategiya adaptatsii. Farmakologicheskaya regulyaciya sostoyanij dezadaptatsii* [Pharmacological adaptation strategy. Pharmacological regulation of maladaptation states]. Moscow: B.I., 1986. P. 3–11. (In Russian)].
2. Воскресенский О.М. *О связях адаптогенного и антиоксидантного действия. Адаптация и адаптогены.* Владивосток, 1977. С. 91–96. [Voskresenskiy O.M. *O svyazyah adaptogennogo i antioksidantnogo dejstviya. Adaptatsiya i adaptogeny* [On the links of adaptogenic and antioxidant effects. Adaptation and adaptogens]. Vladivostok, 1977. P. 91–96. (In Russian)].
3. Дудниченко А.В., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. *Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике.* Харьков: РА-Каравелла, 2001. [Dudnichenko A.V., Krasnopol'skiy Yu.M., Shvets V.I. *Liposomal'nye lekarstvennyye preparaty v eksperimente i klinike* [Liposomal drugs in experiment and clinic]. Kharkov: RA-Karavella Publ, 2001. (In Russian)].
4. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агелдинов Р.А. Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги *Moschus moschiferus* методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. *Биомедицина.* 2018;1:19–39. [Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A. Analiz biologicheskii aktivnykh soedinenij muskusa kabargi *Moschus moschiferus* metodom gazovoj hromatografii s mass-selektivnym detektorom [The analysis of biologically active compounds of musk of *Moschus moschiferus* by gas chromatography with a mass-selective detector. *Biomedicine.* 2018;1:19–39. (In Russian)].
5. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Котенко К.В., Люблинский С.Л. *Очерки спортивной фармакологии. Т. 3. Векторы фармакорегулирования.* М., СПб.: Ай-синг, 2014. 356 с. [Karkischenko N.N., Ujba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B., Kotenko K.V., Lyublinskiy S.L. *Ocherki sportivnoj farmakologii. T. 3. Vektory farmakoregulirovaniya* [Essays on sports pharmacology. Vol. 3. Pharmacoregulatory vectors]. Moscow, Saint Petersburg: Ajsing Publ., 2014. 356 p. (In Russian)].
6. Сариев А.К., Абаимов Д.А., Сейфулла Р.Д. Проблема повышения биодоступности лекарственных средств методами нанофармакологии: фармакокинетика липосомальных препаратов. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2010;73(1):34–38. [Sariev A.K., Abaimov D.A., Seifulla R.D. Problema povysheniya biodostupnosti lekarstvennykh sredstv metodami nanofarmakologii: farmakokinetika liposomal'nykh preparatov [The problem of increasing the bioavailability of drugs by nanopharmacology methods: pharmacokinetics of liposomal drugs]. *Experimental and Clinical Pharmacology.* 2010;73(1):34–38. (In Russian)]. DOI: 10.30906/0869-2092-2010-73-11-34-38
7. Уйба В.В., Котенко К.В., Корчажкина Н.Б., Петрова Н.Б., Михайлова А.А. *Применение мускуса кабарги в клинической практике (метод. реком.)*. М., 2013. 18 с. [Ujba V.V., Kotenko K.V., Korchazhkina N.B., Petrova N.B., Mikhajlova A.A. *Primenenie muskusa kabargi v klinicheskoy praktike (metod. rekom.)* [The use of musk musk deer in clinical practice (guidelines)]. Moscow, 2013. 18 p. (In Russian)].
8. Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L. Proteomic Analysis in the Identification of Active Components in the Preputial Gland Secretion of the Siberian Musk Deer. *Biomedicine.* 2019;15(1):35–47. DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-35-47
9. Li D., Chen B., Zhang L. The musk chemical composition and microbiota of Chinese forest musk deer males. *Scientific Report.* 2016.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

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

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

Люблинский Станислав Людвигович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Stanislav L. Lyublinskiy, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

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

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
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

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

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-46-57>



ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ ПЕПТИДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЁЗ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ (*RANGIFER TARANDUS*) НА ПРОЦЕССЫ КАТЕХОЛАМИНЭРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭСТРАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ КРЫС

Д.А. Абаимов¹, А.Н. Осинцев², А.В. Шарабанов², М.С. Дуля^{3,*}, Р.А. Агельдинов³, В.Н. Каркищенко³

¹ ФГБНУ «Научный центр неврологии»
125367, Российская Федерация, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80

² ЗАО «ФЕРМЕНТ»
143985, Российская Федерация, Московская обл., Балашиха, дер. Полтево, д. 70А

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 изучалось содержание катехоламинов в моче самок крыс в норме и при развитии возраст-зависимых изменений, связанных с нарушениями эстрального цикла, на ранней стадии развития менопаузы, а также оценивалось возможное корригирующее влияние и отложенные эффекты набора пептидных экстрактов эндокринных желёз северного оленя (*Rangifer tarandus*) на сдвиги фаз эстрального цикла у животных и на возрастные нарушения в работе системы «гипоталамус — аде-ногипофиз — гонады».

Ключевые слова: экстракт эндокринных желез, эстральный цикл, северный олень, катехоламины, хроматография, пептиды

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Абаимов Д.А., Осинцев А.Н., Шарабанов А.В., Дуля М.С., Агельдинов Р.А., Каркищенко В.Н. Влияние комбинации пептидных экстрактов эндокринных желёз северного оленя (*Rangifer tarandus*) на процессы катехоламинэргической регуляции эстральной функции крыс. *Биомедицина*. 2019;15(4):46–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-46-57>

Поступила 05.08.2019

Принята после доработки 15.10.2019

Опубликована 10.12.2019

EFFECTS OF A COMBINATION OF PEPTIDE EXTRACTS FROM REINDEER ENDOCRINE GLANDS (*RANGIFER TARANDUS*) ON THE CATHOLAMINERGIC REGULATION OF THE ESTRAL FUNCTION IN RATS

Denis A. Abaimov¹, Alexey N. Osintsev², Andrey V. Sharabanov², Maxim S. Dulya^{3,*}, Ruslan A. Ageldinov³, Vladislav N. Karkischenko³

¹ Research Center of Neurology
125367, Russian Federation, Moscow, Volokolamskoe highway, 80

² FERMENT
143985, Russian Federation, Moscow region, Balashikha, Poltevo village, 70A

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

This study was aimed at investigating the concentration of urinary catecholamines in female rats both in the normal state and during the development of age-dependent changes associated with estrous cycle disorders at early menopause stages. In addition, we set out to assess possible corrective and delayed effects of a combination of peptide extracts from reindeer endocrine glands (*Rangifer tarandus*) on both phase changes in the estrous cycle and age-related disorders in the functioning of the hypothalamus — adenohipophysis — gonadal system in experimental animals.

Keywords: endocrine gland extract, estrous cycle, reindeer, catecholamines, chromatography, peptides

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

For citation: Abaimov D.A., Osintsev A.N., Sharabanov A.V., Dulya M.S., Ageldinov R.A., Karkischenko V.N. Effects of a Combination of Peptide Extracts from Reindeer Endocrine Glands (*Rangifer Tarandus*) on the Catholaminergic Regulation of the Estral Function in Rats. *Journal Biomed.* 2019;15(4):46–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-46-57>

Submitted 05.08.2019

Revised 15.10.2019

Published 10.12.2019

Введение

Катехоламины — первые нейромедиаторы, участие которых в регуляции эстрального цикла было доказано еще в середине прошлого века в классических опытах Дж. Эверетта и Ч. Сойера [9].

Известно, что именно в возрасте 8–12 мес. у крыс начинают происходить изменения в эстральном цикле, наблюдается задержка во времени начала преовуляторного подъема [12, 14, 15].

Так, например, в исследовании [3] одним из объектов изучения стали 13–14-мес. крысы, у которых еще встречались отдельные эстральные циклы, но уже наблюдалось удлинение стадии диэструса и/или эструса. Начальные этапы угасания репродуктивной функции самок стареющих крыс сопровождаются постепенным исчезновением характерной суточной динамики содержания норадреналина, что, в свою очередь, связывается с нарушениями работы циркадианных центров в супрахиазмальных ядрах гипоталамуса.

Существует ряд литературных данных, свидетельствующих о возраст-зависимых изменениях в сывороточном уровне катехоламинов. В частности, обнаружено

значительное повышение уровня катехоламинов в процессе развития климактерических изменений у женщин в начальный период менопаузы. Однако существующие данные носят довольно противоречивый характер. В одних статьях указывается на то, что повышается уровень всех катехоламинов без исключения, в других — подчеркивается особенное значение повышения адреналина и норадреналина. С указанными изменениями связывают развитие особого типа кардиомиопатий (кардиомиопатия Такоцубо) у женщин во время климакса [13]. В этой связи нам представлялось важным проанализировать уровень катехоламинов в моче лабораторных животных в зависимости от периода развития и сопутствующих возрастных изменений в работе репродуктивной системы.

Отличительной особенностью фармакологического влияния препаратов пептидной природы является эффект кратковременного воздействия и развитие фармакодинамики после применения в течение одного часа независимо от способа введения. В дальнейшем концентрация действующих веществ падает за счет метаболической трансформации пептидов и включения их в пул биохими-

ческих трансформаций [7]. В исследовании нам представлялось важным проанализировать эффект пептидных экстрактов эндокринных желез и репродуктивных органов (эпифиз, гипофиз, желтое тело, яичники) северного оленя (*Rangifer tarandus*), которые были получены с помощью метода мягкого лизиса. Состав указанных экстрактов представляет собой набор короткоцепочечных пептидов и олигопептидов, с молекулярными массами, лежащими преимущественно в области от 100 до 2000 Да, с незначительным включением минорных компонентов с массой от 3 до 5 кДа. Метод хронотерапии, предложенный в данной работе, предполагает возможность пролонгирования действия клеточных экстрактов пептидной природы за счёт наличия второй фазы высвобождения основного действующего вещества либо путём последовательного стимулирования фармакологических мишеней разными субстанциями. Экстракты пептидной природы (ЭПП) применяются в виде набора пептидных экстрактов (НПЭ) с последовательным их разведением и введением, с применением технологии хронотерапии. В основе действия данного препарата лежит полипептидный класс-эффект в виде регуляции центрального звена «гипоталамус — аденогипофиз — гонады» в условиях возрастного дефицита эстрогенов.

Функционирование системы «гипоталамус — аденогипофиз — гонады» может зависеть от факторов различной этиологии. Известно, что стрессорные воздействия, развитие десинхроноза, психоэмоциональные нарушения, естественное старение организма могут вызывать сбои в деятельности системы, ответственной за репродуктивный потенциал организма [1, 8].

Относительно низкий уровень эстрогенов и прогестинот стимулирует, а высокий уровень — угнетает активность половых центров гипоталамуса. Последовательное сочетание положительной и отрицательной обратной связи определяет циклическую

активность катехоламинов, осуществляющих контроль репродуктивной функции [5].

Цель работы — изучить содержание катехоламинов в моче самок крыс в норме и при развитии возраст-зависимых изменений, связанных с нарушениями эстрального цикла, на ранней стадии развития менопаузы, а также оценить возможное корректирующее влияние и отложенные эффекты экстрактов пептидной природы на возрастные нарушения в работе системы «гипоталамус — аденогипофиз — гонады».

Задачи исследования:

- выявить изменения эстрального цикла лабораторных крыс после воздействия препаратов ЭПП в виде НПЭ;
- изучить содержание катехоламинов в моче самок крыс в предменопаузе в контроле и на фоне фармакологического воздействия при возрастных изменениях.

Материалы и методы

Для исследования выбраны самки крыс, которые принесли 5–6 потомств. Исследование проводилось в два отдельных возрастных периода. Возраст самок в первом периоде составлял 10 мес., что соответствует среднему (зрелому) возрасту половозрелой особи. Далее крысы были перероджены до 13-ти мес., что соответствует возрасту пременопаузы, когда эстральный цикл крыс становится нерегулярным.

Самки были разделены на две группы: экспериментальная и контрольная. Экстракты пептидной природы представлены в виде НПЭ, которые вводились последовательно, внутримышечно с временным промежутком (эпифиз + желтое тело в 9³⁰ ч по МСК → гипофиз + яичники в 11³⁰ ч по МСК).

Экстракты пептидной природы изготовлены из мозговых придатков и половых желез внутренней секреции северного оленя методом щадящего лизиса. Северные олени относятся к животным с ярко выраженными сезонными биологическими циклами [6].

Таблица 1. Дизайн эксперимента

Table 1. Design of the experiment

Параметр	Опытная группа	Контрольная группа
Препарат и время введения	Эпифиз + желтое тело, 9 ³⁰ Гипофиз + яичники, 11 ³⁰	Изотонический р-р, 9 ³⁰ Изотонический р-р, 11 ³⁰
Доза	400 мкг (100 мкл)	100 мкл

Пептидные экстракты вводились последовательно в узком временном интервале между 9³⁰ и 11³⁰ ч циркадианного времени (табл. 1). Продолжительность введения препарата составляла 21 день.

Выбор дозы был пересчитан на среднюю массу самок крыс, приведен по аналогии с препаратом Пинеамин (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия), действующим веществом которого являются полипептиды эпифиза PPG — 10 мг, восстанавливающие нормальную функциональную плотность пинеалоцитов и стимулирующие синтез эндогенного мелатонина. После в/м введения препарата полипептиды PPG попадают в нижнюю полую вену, минуя портальную систему, затем — в правое предсердие и далее — в артериальный круг по ветвям средней и задней мозговых артерий, минуя гематоэнцефалический барьер, сразу попадая внутрь пинеалоцитов через аксозавальные синапсы, где активируют синтез мелатонина и серотонина, что в дальнейшем направлено на купирование нейровегетативных проявлений климактерического синдрома [2].

Выявление изменений эстрального цикла лабораторных крыс после воздействия экстрактами пептидной природы (ЭПП) в виде набора пептидных экстрактов

На цитологическое исследование были представлены 60 препаратов влажных мазков от 20-ти крыс. Мазки были окрашены азур-эозином (по Романовскому).

Исследование мазков проводили в проходящем свете под микроскопом Leica

DM2500, под увеличением $\times 400$, с помощью установленной на этот же микроскоп цифровой камеры Leica DFC450 и программного обеспечения LASV 4.8.

Статистическую обработку данных проводили с использованием *U*-критерия Манна — Уитни. Также применяли ранговые корреляции Спирмена. Отмеченные корреляции с содержанием катехоламинов значимы на уровне $p < 0,05$.

Метод определения катехоламинов в моче крыс

В микропробирку на 1,5 мл вносили 0,5 мл мочи крыс или градуировочного р-ра (смесь определяемых веществ в рабочих концентрациях) и добавляли 50 мкл внутреннего стандарта изопреналина в концентрации 5 мкг/мл либо вносили 1 мл фосфатного буфера для контроля. Добавляли 50 мкл 0,1%-ного р-ра метабисульфита калия, 500 мкл 1М трис-буфера, 25 мг адсорбента (активированного Al_2O_3 , BASi Inc., США). Далее пробы встряхивали на вибромиксере в течение 5-ти мин. Затем образцы центрифугировали на центрифуге на скорости 3000 об./мин в течение 3-х мин, надосадочную жидкость удаляли пастеровской пипеткой и отбрасывали. Осадок адсорбента дважды промывали пипеткой по 1 мл бидистиллированной воды. Для десорбции (выделения) катехоламинов к промытому адсорбенту добавляли 500 мкл 0,2 М $HClO_4$, встряхивали на вибромиксере 1 мин, центрифугировали при 2000 об./мин в течение 3-х мин. Надосадочную жидкость в объеме 20 мкл подвергали хроматографическому разделению.

Метод хроматографического разделения

Содержание моноаминов и их метаболитов определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ион-парная хроматография) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД) на жидкостном хроматографе System Gold (Beckman Coulter, Inc., США), оснащённом амперометрическим детектором RECIPE EC3000 (Германия), с инжектором Rheodyne 7125, объём вкола — 20 мкл. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке Nucleodur C18 Gravity, 4,6×250 мм, диаметр пор — 5 мкм (Mashery-Nagel GmbH & Co. KG, Германия). Насос System Gold 125 (Beckman Coulter, Inc., США), скорость потока подвижной фазы — 1 мл/мин, при давлении 200 атм. Мобильная фаза: 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 1,1 мМ октансульфоновой кислоты, 0,1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрила (pH 3,0). Измерение проводили с помощью электрохимического детектора RECIPE EC 3000 (Германия), оборудованном измерительной

ячейкой ClinLab ECD-Cell, Model Sputnik, со стеклоглеродным рабочим электродом (+0,65 В) и хлорсеребряным электродом сравнения Ag/AgCl. Регистрацию образцов и обработку хроматограмм проводили с применением аппаратно-программного комплекса «МультиХром 1,5» («Амперсенд»). Все использовавшиеся для анализа реактивы были высокой степени чистоты: о. с. ч., х. ч. или analytical grade. Для калибровки хроматографа использовали смеси рабочих стандартов определяемых веществ. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом «внутреннего стандарта» исходя из отношений площади пиков в стандартной смеси и в образце [4, 11].

В этих условиях время удерживания составляло: 1) для норадреналина — 4,67 мин; 2) для адреналина — 5,22 мин; 3) для дофамина — 7,77 мин. Внутренний стандарт (адреномиметик изопреналин с финальной концентрацией 500 нг/мл) имел время удерживания 11,53 мин (рис. 1).

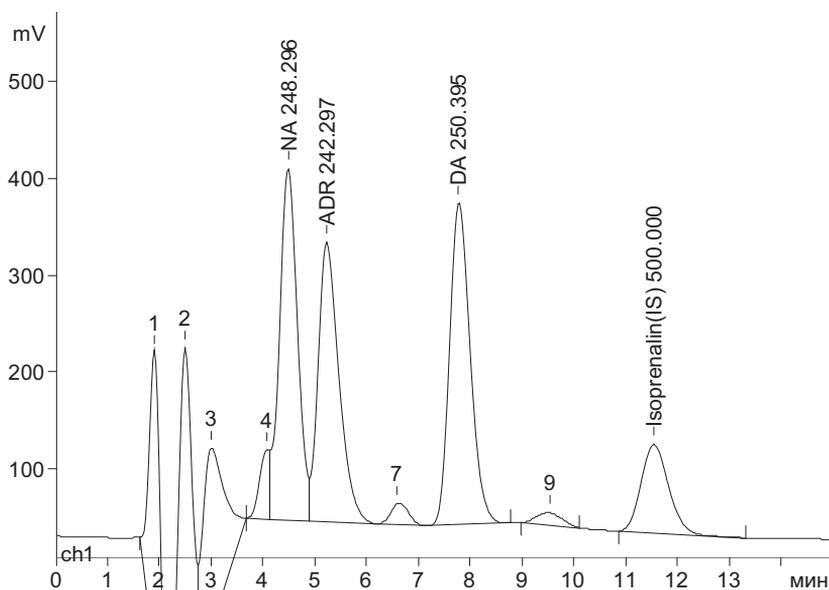


Рис. 1. Типичная хроматограмма анализируемых соединений в концентрации 250 нг/мл.

Fig. 1. A typical chromatogram for the compounds under study at a concentration of 250 ng/ml.

Предел количественного определения для всех трёх анализируемых катехоламинов составил 3,13 нг/мл. Относительная ошибка метода для концентрации 3,13 нг/мл не превышала 10%. Установлено, что в диапазоне концентраций 3,13–1000 нг/мл калибровочные кривые всех трёх анализов линейны (рис. 2).

Параметры хроматографических кривых для анализируемых соединений представлены в табл. 2.

Нулевая проба при построении кривой не учитывалась. Отклонения от номинальной концентрации для всех калибровочных

стандартов не превышали допустимых значений (20% для нижнего предела количественного определения и 15% для остальных стандартов).

Результаты и их обсуждение

Цитологическое исследование влагалищных мазков самок крыс

Результаты проведенного цитологического исследования представлены в табл. 3, 4 и позволяют сделать следующие заключения.

Цитологические исследования влагалищных мазков у 10-мес. крыс в конце

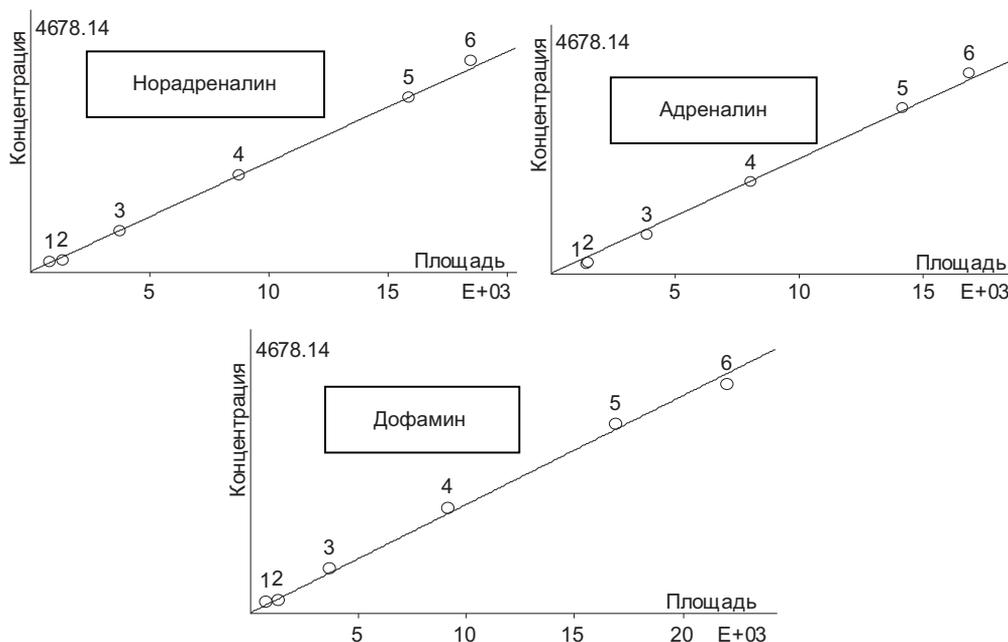


Рис. 2. Калибровочные кривые анализируемых катехоламинов.

Fig. 2. Calibration curves of the catecholamines under study.

Таблица 2. Параметры градуировочных кривых анализируемых соединений

Table 2. Parameters of the calibration curves of the compounds under study

Вещество	Формула градуировочной зависимости	Коэффициент корреляции	С. К. О., %
Норадреналин	$Q=0,195739 \cdot A$	0,999462	2,949
Адреналин	$Q=0,215921 \cdot A$	0,999927	6,430
Дофамин	$Q=0,17908 \cdot A$	0,998289	5,266

Таблица 3. Стадии эстрального цикла в группе I крыс

Table 3. Estrous cycle stages in group I rats

Номер животного		Стадия эструса	
1	Диэструс	Диэструс	Эструс
2	Эструс	Метаэструс	Эструс
3	Не показателен	Не показателен	Метаэструс
4	Эструс	Метаэструс	Эструс
5	Не показателен	Диэструс	Не показателен
6	Не показателен	Диэструс	Метаэструс
7	Метаэструс	Эструс	Метаэструс
8	Не показателен	Не показателен	Диэструс
9	Не показателен	Метаэструс	Эструс
10	Не показателен	Эструс	Прозэструс

Таблица 4. Стадии эстрального цикла в группе II крыс (контрольная группа)

Table 4. Estrous cycle stages in group II rats (control)

Номер животного		Стадия эструса	
1	Эструс	Эструс	Диэструс
2	Эструс	Диэструс	Метаэструс
3	Метаэструс	Диэструс	Эструс
4	Не показателен	Прозэструс	Диэструс
5	Эструс	Эструс	Диэструс
6	Не показателен	Не показателен	Метаэструс
7	Эструс	Не показателен	Метаэструс
8	Метаэструс	Эструс	Прозэструс
9	Метаэструс	Эструс	Метаэструс
10	Не показателен	Эструс	Метаэструс

острого эксперимента выявили достоверные ($p < 0,05$) различия в первой группе по сравнению с контролем. Наличие в мазках безъядерных клеток и слизи свидетельствует о том, что животные, получавшие препарат, находятся преимущественно в фазах эструса и метаэструса.

Отмечена корреляция ($p < 0,05$) по содержанию катехоламинов норадреналина (NA), адреналина (ADR) и дофамина (DA) в суточной моче 10-мес. крыс и сдвиги в фазах эстрального цикла. Цитологические исследования влажных мазков в конце острого эксперимента показали наличие сдвигов фаз эстрального цикла, где сумма рангов в 2 раза отличалась по стимулирующему эффекту, животных, экспонированных к препарату в сравнении с контролем, а также корреляцию высокого стимулирующего действия и низкого раздражающего действия

на фазы эстрального цикла к содержанию катехоламинов в суточной моче 10-мес. самок крыс.

Содержание катехоламинов в моче самок крыс

Результаты анализов представлены в табл. 5, 6. Сбор суточной мочи в указанных группах животных производился дважды. Первый сбор производился у 10-мес. крыс после субхронического (21 день) введения экстрактов пептидной природы с целью выяснения кратковременных эффектов после подострого введения. Второй сбор суточной мочи с целью выявления отложенных эффектов указанного препарата на содержание катехоламинов производился спустя 3 мес. после последнего подострого введения препарата. Полученные данные представлены в табл. 5 (краткосрочный эффект подострого введения)

Таблица 5. Концентрация катехоламинов в моче 10-мес. крыс после субхронического введения набора пептидных экстрактов

Table 5. Concentrations of urinal catecholamines in 10-month-old rats after subchronic administration of peptide extracts

№ животного	NA (нг/мл)	ADR (нг/мл)	DA (нг/мл)	Объем (мл)	NA (нг/сут)	ADR (нг/сут)	DA (нг/сут)
11	25,49	28,13	92,35	20	509,8	562,6	1847
12	69,02	32,03	150,13	8,9	614,278	285,067	1336,157
13	42,4	38,06	190,57	3,8	161,12	144,628	724,166
14	42,86	33,98	101,84	7,8	334,308	265,044	794,352
15	57,66	37,71	163,65	6,9	397,854	260,199	1129,185
16	41,55	32,78	90,66	6,6	274,23	216,348	598,356
17	60,08	36,66	79,83	10	600,8	366,6	798,3
18	82,33	27,16	162,59	9,4	773,902	255,304	1528,346
19	53,8	11,84	50,93	20	1076	236,8	1018,6
20	45,74	24,99	108,98	7,8	356,772	194,922	850,044
21	45,74	36,06	113,2	6,3	288,162	227,178	713,16
22	75,56	34,23	212,19	4,7	355,132	160,881	997,293
23	40,43	13,53	74,5	9,1	367,913	123,123	677,95
24	38,54	17,56	72,04	8,9	343,006	156,284	641,156
25	57,18	31,75	95,66	5,9	337,362	187,325	564,394
26	46,84	22,35	254,35	7,2	337,248	160,92	1831,32
27	18,64	11,34	27,49	15	279,6	170,1	412,35
28	40,75	14,59	56,64	10	407,5	145,9	566,4
29	66,37	44,18	117,14	6,9	457,953	304,842	808,266
30	52,08	25,74	96,63	6,8	354,144	175,032	657,084

Таблица 6. Концентрация катехоламинов в моче 13-мес. крыс спустя 3 мес. после финальной инъекции подострого введения набора пептидных экстрактов

Table 6. Concentrations of urinal catecholamines in 13-month-old rats 3 months after the final subacute administration of peptide extracts

№ животного	NA (нг/мл)	ADR (нг/мл)	DA (нг/мл)	Объем (мл)	NA (нг/сут)	ADR (нг/сут)	DA (нг/сут)
11	49,1	9,74	105,28	9,8	481,18	95,452	1031,744
12	108,71	26,14	185,73	10	1087,1	261,4	1857,3
13	251,42	69,86	510,1	4,5	1131,39	314,37	2295,45
14	21,3	8,88	51,55	20	426	177,6	1031
15	200,55	35,05	408,45	4,1	822,255	143,705	1674,645
16	83,94	23,12	248,43	8	671,52	184,96	1987,44
17	141,23	21,6	244,28	5,2	734,396	112,32	1270,256
18	62,37	5,98	92,93	10,5	654,885	62,79	975,765
19	25,13	8,75	88,85	18	452,34	157,5	1599,3
20	136,78	67,89	181,4	6,6	902,748	448,074	1197,24
21	103,17	29,94	266,04	6,5	670,605	194,61	1729,26
22	92,74	6,58	173,87	8,1	751,194	53,298	1408,347
23	130,5	13,14	150,43	9,5	1239,75	124,83	1429,085
24	89,09	11,88	200,99	9	801,81	106,92	1808,91
25	229,5	58,37	341,6	3,6	826,2	210,132	1229,76
26	50,7	8,96	182,69	9	456,3	80,64	1644,21
27	22,7	15,9	67,23	18	408,6	286,2	1210,14
28	46,58	47	128,66	9,6	447,168	451,2	1235,136
29	164,86	63,05	307,36	6	989,16	378,3	1844,16
30	76,78	16,64	199,74	6,2	476,036	103,168	1238,388

и табл. 6 (отложенный эффект). Приведены значения концентрации катехоламинов (норадреналина, адреналина и дофамина), выраженные в нг/мл, объем суточной мочи и количество катехоламинов — в нг, экскретированных за сутки (нормированные на объем суточной мочи).

Полученные данные были статистически обработаны методом дисперсионного анализа, на основании которого показано, что субхроническое внутримышечное введение набора пептидных экстрактов вызывает кратковременный эффект на уровень катехоламинов, выражающийся в достоверном реактивном повышении уровня дофамина, адреналина и норадреналина в суточной моче крыс в сравнении с контролем (рис. 3). Также была отмечена

тенденция к повышению уровня адреналина, что в целом может свидетельствовать о мягком тонизирующем эффекте препарата.

Повторный сбор суточной мочи выполняли спустя 3 мес., в течение которых животные не получали препарата. Данный пробоотбор был предназначен для выявления возможных отложенных эффектов субхронического введения набора экстрактов пептидной природы на уровень катехоламинов или неуправляемых факторов, связанных с пролиферативным действием пептидов. Дисперсионный анализ при межгрупповом сравнении не выявил достоверных отличий между контрольной группой животных и группами животных, принимавших препарат (рис. 4).

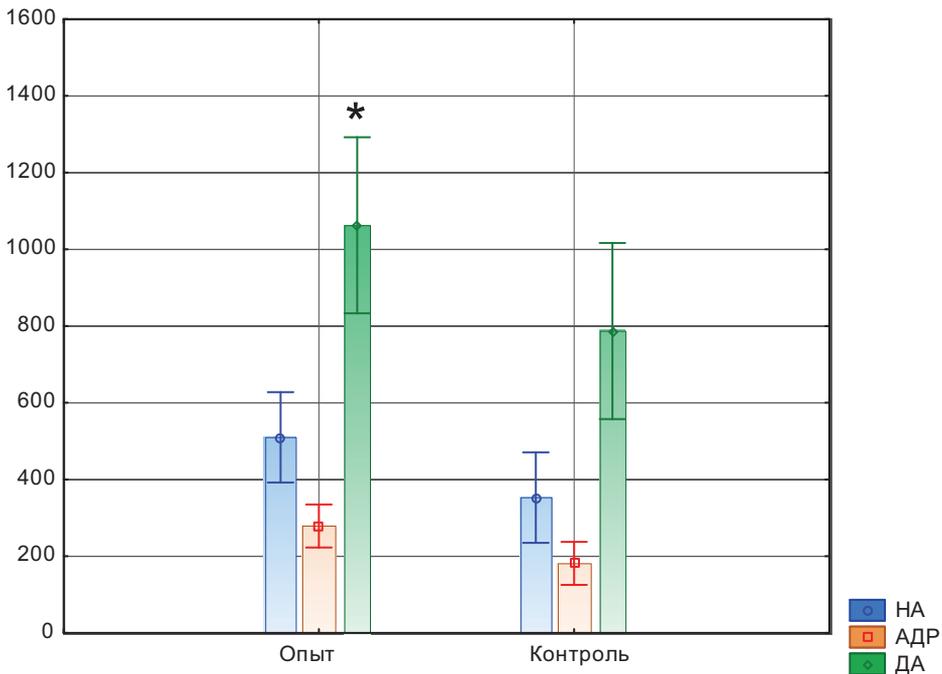


Рис. 3. Влияние субхронического введения набора пептидных экстрактов на концентрацию катехоламинов в моче 10-мес. крыс.

Примечание: * — достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$, критерий Фишера.

Fig. 3. Effects of subchronic peptide extract administration on the concentration of urinary catecholamines in 10-month-old rats.

Note: * — significant difference from control, $p < 0.05$, Fisher's test.

В то же время нужно отметить, что нами были обнаружены выраженные отличия в содержании катехоламинов во всех группах крыс по сравнению с первым пробоотбором, причем для норадреналина и дофамина эти отличия были статистически значимы

($p < 0,05$, критерий Фишера). В среднем у 13-мес. крыс наблюдается увеличение уровня катехоламинов на 40–50% по сравнению с концентрацией катехоламинов, обнаруживаемой в этих группах животных в 10-мес. возрасте (табл. 7). Полученные результаты хоро-

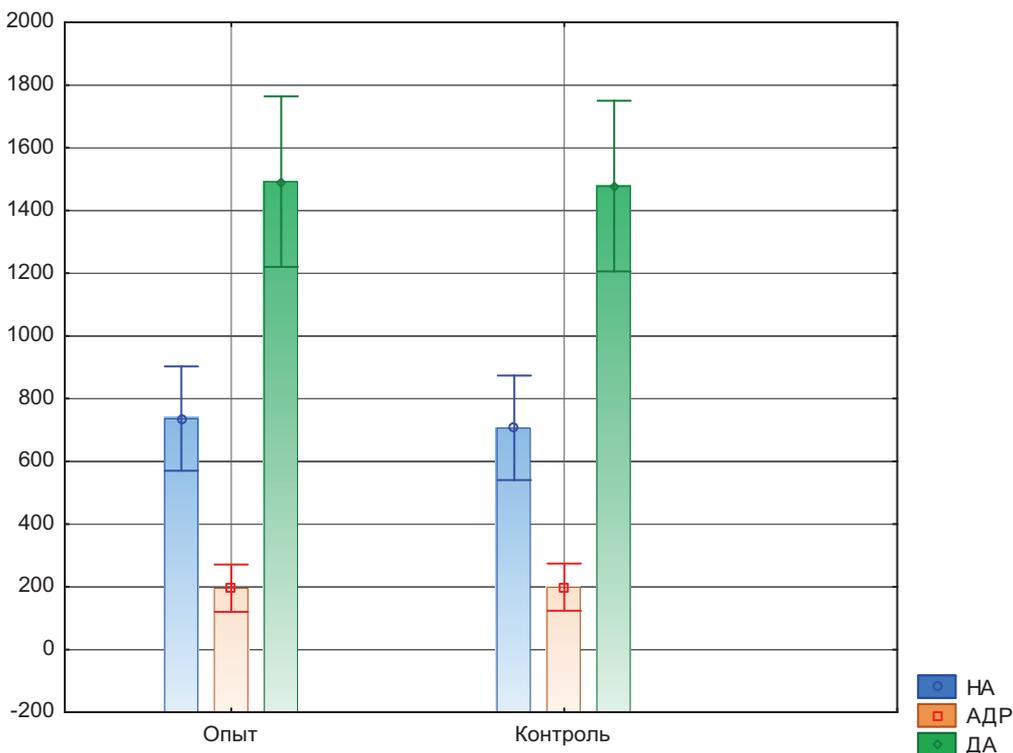


Рис. 4. Влияние субхронического введения смеси пептидов на концентрацию катехоламинов в моче 13-мес. крыс.
Fig. 4. Effects of subchronic administration of peptide extracts on the concentration of urinal catecholamines in 13-month-old rats.

Таблица 7. Сводные данные концентрационных значений катехоламинов, объединённые по группам и возрастам, нг/сут

Table 7. Summary data on the catecholamine concentration values, combined by groups and age, ng/day

Вещество Возраст самок крыс	Норадреналин (NA)		Адреналин (ADR)		Дофамин (DA)	
	10 мес.	13 мес.	10 мес.	13 мес.	10 мес.	13 мес.
Группа 1	509,906±85,202*	736,381±79,378#	247,212±20,601*	206,968±39,117	1062,450±126,071*	1492,014±145,152#
Группа 2	352,802±16,464	699,872±88,658#	176,045±17,204	194,109±46,491	786,937±126,022	1457,570±90,425#

Примечания: * — значимые отличия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); # — возрастные отличия по сравнению с предыдущими значениями внутри группы. При $p < 0,05$, критерий Фишера.

Notes: * — significant differences compared to the control ($p < 0.05$); # — age differences compared to previous values within the group. For $p < 0.05$, Fisher's test.

шо согласуются с литературными данными, согласно которым доказано: как возраст сам по себе, так и менопауза могут повышать уровень катехоламинов в крови [16], что, в свою очередь, приводит к ослаблению активности вегетативной нервной системы [10].

Выводы

1. Выявлено наличие сдвигов фаз эстрального цикла лабораторных крыс после воздействия препаратов пептидной природы в виде набора пептидных экстрактов и последовательного их введения.

2. Субхроническое (инъекционное) введение смеси пептидов в течение 21-го дня характеризуется достоверным повышением уровня катехоламинов в суточной моче 10-мес. крыс.

3. Сравнительный анализ суточной мочи самок крыс в возрасте 10-ти и 13-ти мес. обнаруживает достоверное возраст-зависимое повышение содержания катехоламинов.

4. Значимого отложенного влияния пептидов на содержание катехоламинов в суточной моче 13-мес. крыс не выявлено.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Алексеев Б.Е., Белоус И.М. Сексуальные дисфункции у женщин с психогенными депрессиями. *Обзорные психиатрии и медицинской психологии*. 2013;1:22–24. [Alekseev B.E., Belous I.M. Seksual'nye disfunkcii u zhenshchin s psihogennymi depressiyami [Sexual dysfunctions in women with psychogenic depressions]. *Obzornye psixiatrii i medicinskoj psihologii* [Review of psychiatry and medical psychology]. 2013;1:22–24. (In Russian)].
2. Касян В.Н., Адамян Л.В. Патофизиология приливов жара. Фокус на нейрогормональную регуляцию. *Проблемы репродукции*. 2017;1:115–121. [Kasyan V.N., Adamyan L.V. Patofiziologiya prilivov zhara. Fokus na nejrogormonal'nyuyu regulyatsiyu [Pathophysiology of hot flashes. Focus on neurohormonal regulation]. *Problemy reprodukcii* [Problems of reproduction]. 2017;1:115–121. (In Russian)].
3. Корневский А.В., Милотина Ю.П., Степанов М.Г., Керкешко Г.О., Арутюнян А.В. О взаимосвязи циркадианных и овариальных циклов в гипоталамической регуляции репродукции (экспериментальное исследование). *Журн. акуш. и женск. бол.* 2007;56(4):24–30. [Korenevskij A.V., Milyutina Yu.P., Stepanov M.G., Kerkeshko G.O., Arutyunyan A.V. O vzaimosvyazi tsirkadiannyh i ovarial'nyh tsiklov v gipotalamicheskoj regulyatsii reprodukcii (eksperimental'noe issledovanie) [On the relationship of circadian and ovarian cycles in the hypothalamic regulation of reproduction (experimental study)]. *Zhurn. akush. i zhensk. bol.* [J. of Obstetrics and Women's Diseases]. 2007;56(4):24–30. (In Russian)].
4. Кудрин В.С., Мирошниченко И.И., Раевский К.С. Различия в механизмах ауторецепторной регуляции биосинтеза и высвобождения дофамина в подкорковых структурах мозга крыс. *Нейрохимия*. 1988;7(1):3–8. [Kudrin V.S., Miroshnichenko I.I., Raevskij K.S. Razlichiya v mekhanizmah autoretspe-
5. *tornoj regulyatsii biosinteza i vysvobozhdeniya dofamina v podkorkovyh strukturah mozga krys* [Differences in the mechanisms of autoreceptor regulation of biosynthesis and dopamine release in rat subcortical brain structures]. *Nejrohimiya* [Neurochemistry]. 1988;7(1):3–8. (In Russian)].
5. Локтаева А.В., Беляков В.И. Характеристика эстрального цикла у крыс и значение кисспептинергической системы в его регуляции. *Вестник молодых ученых и специалистов Самарского гос. ун-та*. 2016;4:32–38. [Loktaeva A.V., Belyakov V.I. Kharakteristika estral'nogo tsikla u krys i znachenie kisseptinergicheskoy sistemy v ego regulyatsii [Characterization of the estrous cycle in rats and the importance of the kisspeptinergic system in its regulation]. *Vestnik molodyh uchenykh i specialistov Samarskogo gos. un-ta* [Bulletin of Young Scientists and Specialists of the Samara State University]. 2016;4:32–38. (In Russian)].
6. Осинцев Н.С., Осинцев С.Н. *Целебные силы пантов*. Манускрипт, 2004. 154 с. [Osincev N.S., Osincev S.N. *Tselebnyye sily pantov* [The healing power of antlers]. Manuskript, 2004. 154 p. (In Russian)].
7. *Пептидоотерапия: клиническое применение*. Рук-во / Под ред. И.С. Ролика. 2-е изд., перераб. М.: РегБиоМед., 2010. 392 с. [Peptidoterapiya: klinicheskoe primeneniye. Ruk-vo. Leadership]. Ed. by I.S. Rolik. 2nd ed., revised. Moscow: RegBioMed, 2010. 392 p. (In Russian)].
8. Перехов А.Я. Депрессия и сексуальные расстройства у женщин в естественной хирургической менопаузе. *Акушерство и гинекология*. 2009;4:6–9. [Perekhov A.Ya. Depressiya i seksual'nye rasstrojstva u zhenshchin v estestvennoj hirurgicheskoy menopauze [Depression and sexual disorders in women in natural surgical menopause]. *Akusherstvo i ginekologiya* [Obstetrics and gynecology]. 2009;4:6–9. (In Russian)].

9. Everett J.W., Sawyer C.H. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rat, disclosed by barbital sedation. *Endocrinology*. 1950;47(3):198–218.
10. Lee S.H., Scott S.D., Pekas E.J., Lee S., Lee S.H., Park S.Y. Taekwondo training reduces blood catecholamine levels and arterial stiffness in postmenopausal women with stage-2 hypertension: randomized clinical trial. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2018;10:1–7.
11. Malikova L.A., Fedotova I.B., Narkevich V.B., Klodt P.M., Kudrin V.S., Poletaeva I.I., et al. Effects of the novel anticonvulsant levetiracetam on the content of monoamines and their main metabolites in the brain structures of rats of the Krushinskii-Molodkina strain. *Neurochemical J*. 2008;2(4):289–292.
12. Mohan Kumar P.S., Thyaga Rajan S., Quadri S.K. Correlations of catecholamine release in the medial preoptic area with proestrous surges of luteinizing hormone and prolactin: effects of aging. *Endocrinology*. 1994;135(1):119–126.
13. Owens J.F., Stoney C.M., Matthews K.A. Menopausal status influences ambulatory blood pressure levels and blood pressure changes during mental stress. *Circulation*. 1993;88(6):2794–2802.
14. Wise P.M. Alterations in the proestrous pattern of median eminence LHRH, serum LH, FSH, estradiol and progesterone concentrations in middle-aged rats. *Life Sci*. 1982;12(2):165–173.
15. Wise P.M., Smith M.J., Dubai D.B., Wilson M.E., Rau S.W., Cashion A.B., et al. Neuroendocrine modulation and repercussions of female reproductive aging. *Recent Prog. Horm. Res.* 2002;57:235–256.
16. Zouhal H., Jacob C., Delamarche P., Gratas-Delamarche A. Catecholamines and the Effects of Exercise, Training and Gender. *Sports Medicine*. 2008;38(5):401–423.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Абаимов Денис Александрович, к.б.н., ФГБНУ «Научный центр неврологии»;
e-mail: abaidenis@yandex.ru

Осинцев Алексей Николаевич,
ЗАО «ФЕРМЕНТ»

Шарабанов Андрей Вячеславович,
ЗАО «ФЕРМЕНТ»;
e-mail: avsharabanov@gmail.com

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

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

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

Denis A. Abaimov, Cand. Sci. (Biol.), Research Center of Neurology;
e-mail: abaidenis@yandex.ru

Alexey N. Osintsev, FERMENT

Andrey V. Sharabanov, FERMENT;
e-mail: avsharabanov@gmail.com

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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ОСОБЕННОСТИ ФАРМАКОДИНАМИКИ ГЛИПРОЛИНОВЫХ ПЕПТИДОВ ПО ПАРАМЕТРАМ ЖИРОВОГО ОБМЕНА И ТРОМБОЭЛАСТОГРАММЫ НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА У КРЫС

Т.Ю. Оберган*, М.Г. Ляпина, М.Е. Григорьева, Л.А. Ляпина

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»
119234, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1/12

При использовании модели животных с метаболическим синдромом получены экспериментальные данные о биологическом действии препаратов пептидов глипролинового ряда — *Pro-Gly-Pro*, *Pro-Arg-Pro*, *Arg-Pro-Gly-Pro* и *Pro-Gly-Pro-Leu* на процессы свертывания крови и липидный обмен в динамике. В условиях повышенной свертываемости крови и гиперхолестеринемии исследованные регуляторные пептиды вводились интраназально многократно в течение 7-ми сут ежедневно через каждые 24 ч. Установлено, что через 20 ч после последнего введения пептидов параметры тромбоэластограммы свидетельствовали о восстановлении функционального состояния свертывающей и противосвертывающей систем организма с одновременным позитивным сдвигом показателей жирового обмена. Эти изменения сохранялись и через 7 сут после отмены введения препаратов. Сущность действия исследованных пептидов заключается в регуляторном воздействии на процессы гемостаза и одновременно на жировой обмен.

Ключевые слова: регуляторные пептиды, глипролины, жировой обмен, метаболический синдром, система гемостаза, фибринолиз, тромбоэластография

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Оберган Т.Ю., Ляпина М.Г., Григорьева М.Е., Ляпина Л.А. Особенности фармакодинамики глипролиновых пептидов по параметрам жирового обмена и тромбоэластограммы на фоне развития метаболического синдрома у крыс. *Биомедицина*. 2019;15(4):58–66. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-58-66>

Поступила 27.05.2019

Принята после доработки 23.09.2019

Опубликована 10.12.2019

GLYPROLINE PEPTIDE PHARMACODYNAMICS IN RATS IN THE SETTING OF METABOLIC SYNDROME BY THE PARAMETERS OF LIPID METABOLISM AND TROMBOELASTOGRAMMA

Tamara Yu. Obergan*, Margarita G. Lyapina, Marina E. Grigorjeva, Ludmila A. Lyapina

Lomonosov Moscow State University
119234, Russian Federation, Moscow, Leninskie gory str., 1/12

In this study, experimental data on the biological action of glyproline peptides — *Pro-Gly-Pro*, *Pro-Arg-Pro*, *Arg-Pro-Gly-Pro* and *Pro-Gly-Pro-Leu* — on the processes of blood coagulation and lipid metabolism were obtained using animal models of metabolic syndrome. Under the conditions of increased blood clotting and hypercholesterolemia, the regulatory peptides under study were administered intranasally for 7 days once every 24 hours. 20 hours after the last peptide administration, thromboelastogram parameters

confirmed the restoration of the functional state of the coagulating and anticoagulant systems. In addition, a simultaneous positive shift in the parameters of lipid metabolism was observed. These changes lasted for 7 days following the withdrawal of the drugs. It is found that the biological action of the peptides under study consists in their simultaneous regulatory impact on the processes of hemostasis and lipid metabolism.

Keywords: regulatory peptides, glyprolines, lipid metabolism, metabolic syndrome, hemostasis, fibrinolysis, thromboelastography

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

For citation: Obergan T.Yu., Lyapina M.G., Grigorjeva M.E., Lyapina L.A. Glyproline Peptide Pharmacodynamics in Rats in the Setting of Metabolic Syndrome by the Parameters of Lipid Metabolism and Tromboelastogramma. *Journal Biomed.* 2019;15(4):58–66. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-58-66>

Submitted 27.05.2019

Revised 23.09.2019

Published 10.12.2019

Введение

В последние годы внимание физиологов, клиницистов и фармакологов приковано к изучению природных соединений с высокой биологической активностью. Большой интерес вызывают биологически активные соединения пептидной природы. Известно, что регуляторные пептиды глипролинового ряда способны предотвращать процессы тромбообразования при повышенной свертываемости крови, возникающей в организме в разных условиях (развитие атеросклеротических изменений в сосудах, сахарный диабет, предтромбоз и др.). При этом могут наблюдаться дислипидемия (сочетание низкого уровня холестерина липопротеидов высокой плотности — Хс-ЛПВП, повышенной концентрации холестерина липопротеидов низкой плотности — Хс-ЛПНП, гипертриглицеридемии), инсулинорезистентность, артериальная гипертензия, снижение фибринолиза, ожирение, повышение уровня глюкозы крови [1, 19]. Все эти нарушения объединены рамками метаболического синдрома (МС) и длительное время протекают бессимптомно. МС — это комплексное заболевание, включающее ряд факторов риска, которые способствуют развитию сердечно-сосудистых осложнений, вызывающих тяжелое течение процесса и в конечном итоге летальность [5, 9].

В проспективных исследованиях было оценено, что МС связан с двукратным увеличением риска развития кардиоваскулярной патологии. Присутствие МС у лиц без диабета повышает вероятность развития диабета 2-го типа в 7 раз [11].

Выяснение патогенеза МС позволяет выработать правильную терапевтическую стратегию, основным принципом которой является изменение стиля жизни — увеличение физической активности, коррекция диеты, снижение массы тела. Эти факторы оказывают позитивное влияние на все метаболические нарушения, характерные для МС. В качестве терапевтических средств рекомендовано применение статинов [10, 11], но в настоящее время нет четких данных относительно степени эффективности препаратов этого ряда у пациентов с МС. Статины снижают кардиоваскулярный риск у пациентов с низким уровнем Хс-ЛПВП, но они не оказывают существенного влияния на повышение их уровня. Фибраты могут быть использованы при атерогенных дислипидемиях, связанных с МС [5].

Для восстановления метаболизма в органах и тканях и коррекции нарушений в системе гемостаза рекомендуется применять различные антилипидемические средства совместно с антитромботическими

[3, 15, 18]. В то же время при нарушениях гомеостаза предлагается использовать ряд пептидных соединений, восстанавливающих компенсаторно-приспособительные реакции организма [4, 16]. Регуляторные пептиды глипролинового ряда (*Pro-Gly-Pro*, *Pro-Gly* и др.) способствуют нормализации функции гемостаза (антиагрегационной, антикоагулянтной и фибринолитической) при развитии гиперхолестеринемии и гипергликемии в организме [16].

Целью исследования явилось изучение динамики сочетанного терапевтического действия регуляторных пептидов *Pro-Gly-Pro* (PGP), *Pro-Arg-Pro* (PRP), *Pro-Gly-Pro-Leu* (PGPL), *Arg-Pro-Gly-Pro* (RPGP) на липидный обмен по данным липидограмм и на состояние системы гемостаза по результатам тромбозластографического исследования на модели крыс с экспериментальным метаболическим синдромом.

Материалы и методы

В работе применялись пептиды PGP, PRP, PGPL, RPGP, синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН (Москва).

В экспериментах было использовано 68 лабораторных белых крыс-самцов популяции линий Wistar массой тела 300–400 г (возраст 9–10 мес.), полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Все эксперименты на животных проведены в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Стокгольм, 15.06.2006 г.). Индуцирование метаболических нарушений вызывали высококалорийной диетой (ВКД) [16]. Состав ВКД включает избыток углеводов, холестерина и насыщенных жирных кислот: жир свинной (15% по массе), манную кашу на молоке (30%), муку пшеничную и белый хлеб (15%), сахарный песок (5%), животные

жиры (маргарин с гидрогенизированными жирами, майонез, сыр) (25%), стандартный сухой корм ООО «Лабораторкорм» (10%). В качестве питья животные получали 10% р-р глюкозы.

До проведения экспериментов крысы в течение 6-ти нед. получали ВКД с целью развития у них МС. Далее при продолжающемся соблюдении ВКД животные были разделены на пять групп: 4 опытные, получавшие 7-кратно интраназально каждый из четырех исследуемых пептидов в дозах 50 мкг/кг, и контрольную, получавшую в те же сроки и подобным образом вместо пептидов 0,85% NaCl (физ. р-р). Дополнительно в экспериментах использовали нормальных здоровых крыс, которые содержались на обычном лабораторном рационе и не получали никаких препаратов.

Через 20 ч после последнего 7-го введения пептидов или физ. р-ра и через 7 сут после отмены их применения при продолжающемся содержании животных на ВКД у них натошак брали кровь на анализы. Взятие крови осуществляли из *vena jugularis* в количестве 2 мл с использованием в качестве консерванта 3,8% р-ра цитрата натрия в соотношении кровь:консервант как 9:1. Образцы крови центрифугировали при 3000 g в течение 10–12 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы.

Показатели жирового обмена в плазме крови исследовали энзиматическим колориметрическим методом с использованием набора реагентов фирмы «Ольвекс Диагностикум» (Россия). При этом определяли концентрации (в ммоль/л) общего холестерина (ОХ), Хс-ЛПВП и триглицеридов. Концентрацию Хс-ЛПНП рассчитывали по формуле $\text{Хс-ЛПНП} = \text{ОХ} - \text{Хс-ЛПВП}$.

В крови определяли биохимические параметры гемостаза по данным тромбозластографического (ТЭГ) исследования: R (время реакции, соответствующее невидимой фазе свертывания), K (время образования сгустка до появления первых фибрино-

вых нитей), α (максимальная амплитуда, свидетельствующая об уровне фибриногена крови), Т (общее время свертывания). Показатель R характеризует 1-ю стадию процесса свертывания крови (образование тромбопластины и фактора X), показатель K — 2-ю стадию свертывания (тромбинообразование), показатель α — 3-ю стадию (процесс фибринообразования), а показатель Т — весь процесс образования сгустка [6]. Определение параметров ТЭГ производили на приборе *Hellige* (Германия).

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке по непараметрическому критерию Манна — Уитни (*Statistica 8.0*).

Результаты и их обсуждение

На модели крыс с МС, который вызывали 6-недельным кормлением пищей, обогащенной жирами и углеводами, при постоянном наблюдении крысами ВКД были продемонстрированы гемостазиологические эффекты (по данным тромбоэластографического исследования крови) регуляторных пептидов с одновременным их влиянием на жировой обмен.

Как видно из табл. 1, в крови контрольных животных, содержащихся на ВКД, наблюдалось достоверное повышение концентрации ОХ (на 18–20%), триглицеридов (на 75%), Хс-ЛПНП (на 45%) и снижение концентрации Хс-ЛПВП (на 17%) по сравнению с нормальными здоровыми крысами. Полученные данные свидетельствовали о развитии МС в организме крыс [12], которым проводили в дальнейшем терапию пептидами.

После многократного, в течение 7-ми раз, применения каждого из пептидов было установлено, что спустя 20 ч у крыс на фоне ВКД в плазме крови снижался уровень ОХ на 8–10%, Хс-ЛПНП — на 8% (PGP), 17% (PRP), 24% (PGPL), 31% (RPGP) и триглицеридов — на 40% (PRP), 44% (PGPL), 49% (PGP), 48% (RPGP). Кроме того, после действия пептида PGPL отмечалось по-

вышение Хс-ЛПВП на 34% по сравнению с контролем (ВКД без введения пептидов). Через 7 сут после отмены применения всех пептидов уровень ОХ сохранялся сниженным. Уровень триглицеридов оставался уменьшенным после действия PRP, RPGP и PGP. В этот период PGPL и RPGP вызывали выраженное повышение Хс-ЛПВП, но не изменяли Хс-ЛПНП, в то время как трипептиды PGP и PRP способствовали еще большему снижению Хс-ЛПНП, чем через 20 ч после последнего 7-го введения пептидов (табл. 1).

По результатам исследования параметров липидного обмена следует, что пептиды глипролинового ряда, содержащие как аргинин, так и лейцин, способны улучшать параметры липидного профиля в условиях развития МС при постоянном соблюдении крысами ВКД. Максимальный гипохолестеринемический эффект был выявлен у RPGP.

По параметрам гемостаза у контрольных животных, получавших ВКД на протяжении более 6-ти недель, отмечалась гиперкоагуляция: достоверно повысилась свертываемость крови по данным ТЭГ: параметры R, K, α , Т уменьшились по сравнению с нормой на 25, 50, 16 и 17% соответственно (табл. 2).

Спустя 20 ч после интраназального многократного (в течение 7-ми раз) введения исследованных пептидов крысам с развившимся МС в плазме крови удлинились показатели ТЭГ по сравнению с контролем: R повышался на 41% (при действии PRP, PGPL), 35% (при действии PGP) и 52% (при действии RPGP); K — на 103% (PRP), 48% (PGP), 70% (PGPL), 80% (RPGP); α — на 54% (PRP), 42% (PGP), 17% (PGPL), 57% (RPGP); Т — на 91% (PRP), 46% (PGP), 51% (PGPL), 69% (RPGP).

Через 7 сут после отмены введения препаратов пептидов ТЭГ исследование крови показало по сравнению с контролем следующее: R оставался повышенным на 37–

Таблица 1. Динамика изменения липидного профиля (ммоль/л) в крови крыс, получавших 7-кратно интраназально пептиды PRP, PGP, PGPL, RPGP на фоне развития метаболического синдрома (M±m)

Table 1. Dynamics of changes in the lipid profile (mmol/l) in the blood of rats with metabolic syndrome treated with 7-fold intranasal peptides PRP, PGP, PGPL, RPGP (M±m)

Группы животных	Общий холестерин	Хс-ЛПВП	Хс-ЛПНП	Триглицериды
Через 20 ч после 7-го введения препаратов				
Контроль (ВКД)	2,017±0,059 ^{##} (100%)	0,908±0,056 (100%)	1,082±0,028 ^{##} (100%)	1,403±0,103 ^{##} (100%)
PRP+ВКД	1,824±0,081 (91%)	0,922±0,042 (102%)	0,898±0,054 ^{**} (83%)	0,839±0,046 ^{**} (60%)
PGP+ ВКД	1,872±0,052 (93%)	0,88±0,048 (97%)	0,992±0,027 [*] (92%)	0,718±0,04 (51%) ^{**}
PGPL+ВКД	1,815±0,081 (90%)	1,217±0,050 (134%) ^{**}	0,822±0,029 [*] (76%)	0,785±0,059 (56%) ^{**}
RPGP+ВКД	1,855±0,052 (92%)	1,062±0,06 (117%)	0,747±0,054 [*] (69%)	0,730±0,063 ^{**} (52%)
Норма (здоровые крысы)	1,674±0,08 ^{**} (83%)	1,081±0,048 [*] (119%)	0,594±0,052 ^{**} (55%)	0,477±0,029 ^{**} (34%) ^{**}
Через 7 сут после отмены введения препаратов				
Контроль (ВКД)	1,773±0,071 ^{##} (100%)	0,822±0,05 (100%)	0,957±0,054 ^{##} (100%)	1,53±0,087 ^{##} (100%)
PRP+ВКД	1,472±0,067 [*] (83%)	0,863±0,043 (105%)	0,618±0,045 ^{**} (65%)	1,22±0,056 [*] (80%)
PGP+ВКД	1,58±0,09 (89%)	0,954±0,082 (116%)	0,626±0,048 ^{**} (66%)	0,84±0,063 ^{**} (55%)
PGPL+ВКД	1,826±0,087 (103%)	1,307±0,065 ^{**} (159%)	0,871±0,048 (91%)	1,514±0,08 (99%)
RPGP+ВКД	1,560±0,083 (88%)	1,183±0,036 ^{**} (144%)	0,928±0,063 (97%)	1,086±0,043 [*] (71%) [*]
Норма (здоровые крысы)	1,401±0,052 ^{**} (79%)	0,945±0,025 [*] (115%)	0,457±0,019 ^{**} (48%)	0,52±0,015 ^{**} (34%)

Примечание: ^{##} p<0,01 — достоверность различий по сравнению с группой «Норма»; ^{*} p<0,05, ^{**} p<0,01 — достоверность различий по сравнению с группой «Контроль (ВКД)». В скобках указан процент от контроля, принятого за 100%.

Note: ^{##} p<0.01 — significance of differences compared to health rats; ^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01 — significance of differences compared to the control. The percentage of the control group taken as 100% is given in brackets.

39% (при действии PRP, PGPL), 34% (PGP) и 46% (RPGP); К обнаруживал еще большее увеличение — на 154% (PRP), 100% (PGP), 85% (PGPL), 116% (RPGP); та хотя и оставалась повышенной, но в меньшей степени, чем через 20 ч после 7-го введения, — на 52% (PRP), 7% (PGP), 20% (PGPL), 54% (RPGP); Т превышал контрольный уровень на 86% (PRP), 49% (PGP), 50% (PGPL), 50% (RPGP) (табл. 2).

Следовательно, по данным ТЭГ исследования, аргининсодержащие пептиды PRP и RGP по сравнению с лейцинсодержащим PGPL оказывали наибольший антикоагулянтный и ингибиторный по отношению к факторам свертывания крови

эффект. Максимальное их действие проявлялось в отношении процесса тромбинообразования (2-й стадии свертывания крови), что продемонстрировано по параметру К ТЭГ крови. Это подтверждает данные работы [2] о влиянии др. пептидов на ингибирование активности фермента тромбина. В наших исследованиях впервые был доказан факт блокады активности тромбина аргининсодержащими пептидами, которые, возможно, из-за присутствия в их структуре аминокислоты аргинина, способствующего выбросу из сосудистого эндотелия оксида азота [14], и проявляют антикоагулянтное действие в организме. Лейцинсодержащий пептид из-за присут-

Таблица 2. Динамика изменения параметров тромбоэластографического исследования крови крыс, получавших 7-кратно интраназально пептиды PRP, PGP, PGPL, RPGP на фоне развития метаболического синдрома (M±m)
Table 2. Dynamics of changes in the parameters of blood thromboelastographic examination of rats with metabolic syndrome treated with 7-fold intranasal peptides PRP, PGP, PGPL, RPGP (M±m)

Группы животных	R, с (%)	K, с (%)	га, мм (%)	T, с (%)
Через 20 ч после 7-го введения препаратов				
Контроль (ВКД)	34,0±6,6 ^{##} (100%)	60,0±3,4 ^{##} (100%)	27,3±1,1 ^{##} (100%)	120,0±14,8 ^{##} (100%)
PRP+ВКД	48,0±5,4 [*] (141%)	140,0±11,0 ^{**} (203%)	42,0±0,5 ^{**} (154%)	230,0±5,03 ^{**} (191%)
PGP+ВКД	46,0±3,1 ^{**} (135%)	90,3±4,8 ^{**} (148%)	39,0±1,6 ^{**} (142%)	175,0±9,7 ^{**} (146%)
PGPL+ВКД	48,0±2,0 ^{**} (141%)	102,0±6,0 ^{**} (170%)	32,0±6,0 ^{**} (117%)	182,0±2,8 ^{**} (151%)
RPGP+ВКД	52,0±7,0 ^{**} (152%)	108,0±3,4 ^{**} (180%)	43,0±1,5 ^{**} (157%)	203,0±3,0 ^{**} (169%)
Норма (здоровые крысы)	60,0±4,2 (176%)	90,0±4,8 (150%)	46,0±4,0 (158%)	196,0±14,1 (163%)
Через 7 сут после отмены введения препаратов				
Контроль (ВКД)	34,4±5,5 ^{##} (100%)	48,0±4,2 ^{##} (100%)	40,8±4,7 (100%)	124,0±3,4 ^{##} (100%)
PRP+ВКД	48,0±9,1 [*] (139%)	122,0±0,9 (254%)	62,4±6,3 ^{**} (152%)	232,0±21,08 ^{**} (186%)
PGP+ВКД	46,2±1,5 [*] (134%)	96,0±3,6 (200%)	43,5±0,5 (107%)	185,7±7,5 ^{**} (149%)
PGPL+ВКД	47,3±0,4 (137%)	90,0±3,47 (185%)	49,0±15,0 (120%)	186,3±3,0 ^{**} (150%)
RPGP+ВКД	50,2±4,2 (146%)	102,0±1,8 (216%)	63,2±3,9 (154%)	215,4±6,2 ^{**} (150%)
Норма (здоровые крысы)	55,0±7,0 (162%)	66,3±4,9 (137%)	42,4±1,0 (103%)	163,7±6,1 (132%)

Примечание: ^{##} p<0,01 — достоверность различий по сравнению с группой «Норма»; ^{*} p<0,05, ^{**} p<0,01 — достоверность различий по сравнению с группой «Контроль (ВКД)». В скобках указан процент от контроля, принятого за 100%.

Note: ^{##} p<0.01 — significance of differences compared to healthy rats; ^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01 — significance of differences compared to the control. The percentage of the control group taken as 100% is given in brackets.

ствия в его структуре молекулы лейцина, положительно влияющего на жировой обмен [7, 13], оказывает наилучшее гипохолестериновое действие, более эффективно, чем другие пептиды, снижая Хс-ЛПНП и триглицериды. Ранее было показано, что регуляторный пептид PGP [8] при интраназальном многократном введении в организм животных с гиперхолестеринемией оказывает нормохолестеринемическое действие с одновременным проявлением фибриндеполимеризационных и антикоагулянтных активностей в кровотоке, что может быть обусловлено его структурными особенностями. Исследованные нами пептиды можно от-

нести к препаратам антитромботического и гипополипидемического действия.

Важная роль в энергетическом и метаболическом обеспечении организма принадлежит крови. С другой стороны, нарушение взаимодействия между пептидами и белками лежит в основе многих заболеваний, в т. ч. и МС. Однако практически отсутствует какая-либо система для выявления индивидуальных молекулярных основ метаболизма, факторов эндогенной природы, определяющих физиологический уровень обмена. В настоящей работе использован специальный подход для выявления влияния биологически активных соединений эндогенного происхождения — пептидов

глипролинового ряда различной структуры, а именно с добавлением таких аминокислот, как аргинин и лейцин.

Полученные новые экспериментальные данные свидетельствуют о сочетанном влиянии аргинин- и лейцинсодержащих глипролинов на процессы свертывания крови и липидный обмен в организме. Эти пептиды относятся к низкомолекулярным эндогенным компонентам метаболизма органов и тканей. Установленные нами результаты свидетельствуют о перспективности использования препаратов регуляторных пептидов в качестве терапевтических средств защиты организма даже в условиях уже развившегося МС. Модельные эксперименты, проведенные с аргининсодержащими пептидами, показали, что под влиянием этих эндогенных метаболитов могут изменяться тромбоэластографические параметры — степень и скорость образования фибринового сгустка в кровотоке, а также липидный профиль крови.

Под воздействием пептидов глипролинового ряда с добавленными аргинином или лейцином наблюдался однонаправленный характер сдвига тромбоэластографических показателей в сторону гипокоагуляции, однако глипролины с добавленным аргинином проявляли больший эффект, чем глипролины с лейцином, что возможно объяснить антитромботическим действием этой аминокислоты [17]. В то же время глипролины с лейцином практически более эффективно влияли на липидный обмен, улучшая степень снижения в крови Хс-ЛПНП и триглицеридов, что обусловлено способностью самого лейцина снижать уровень холестерина при ожирении [13]. Очевидно, что различия в структуре пептидов глипролинового ряда обуславливают определен-

ный характер их функций. Выявлена отчетливая тенденция: поступление в кровь глипролиновых пептидов способствовало снижению времени наступления свертывания крови, т. е. предотвращению процессов фибрино- и тромбообразования, с одновременным улучшением параметров липидного обмена.

Выводы

Полученные результаты указывают на потенциальные возможности указанных соединений влиять на гомеостатические процессы, изменять метаболизм и функции клеток, участвовать в регуляции обмена веществ и поддерживать метаболический баланс. Эти результаты дают новый фактический материал, характеризующий особенности структурно-функционального взаимодействия, лежащие в основе способности исследуемых регуляторных пептидов глипролинового ряда влиять на гомеостаз организма. Становится все более очевидным, что в регуляции метаболических процессов организма значительную роль играют низкомолекулярные соединения пептидной природы.

Таким образом, в условиях моделирования метаболического синдрома у крыс исследованные нами пептиды обладают уникальным сочетанным действием на параметры жирового обмена и показатели системы гемостаза, повышая антикоагулянтные и гипохолестеринемические свойства плазмы крови. Эти пептиды могут быть отнесены к терапевтическим средствам с антитромботическими и гиполипидемическими свойствами при нарушениях жирового обмена. Наиболее выраженное и устойчивое позитивное действие на организм проявляли аргининсодержащие пептиды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ашмарин И.П. *Патологическая физиология и биохимия*. Учебное пособие для вузов. М.: Экзамен, 2005. 478 с. [Ashmarin I.P. *Pathologicheskaja*

fisiologija i biochimia [Pathological physiology and biochemie]. Moscow: Eksamen, 2005. 478 p. (In Russian)].

- Ашмарин И.П., Ляпина Л.А., Андреева Л.А., Ульянов А.М., Пасторова В.Е., Оберган Т.Ю., и др. Лечебный эффект глипролинов Pro-Gly и Pro-Gly-Pro при развитии экспериментального инсулинзависимого диабета. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2008;34(2):38–43. [Ashmarin I.P., Lyapina L.A., Andreeva L.A., Uljanov A.M., Pastorova V.E., Obergan T.Y., et al. Lechebnyy effect gliprolinov Pro-Gly i Pro-Gly-Pro pri razvitiy experimentalnogo insulinzavisimogo diabeta [Medical effect of glyproline Pro-Gly and Pro-Gly-Pro with the developnet of insulin-dependent diabetes]. *Tromboz, gemostaz i reologia [Thrombosis, Hemostasis and Reology]*. 2008;34(2):38–43. (In Russian)].
- Баркаган З.С., Костюченко Г.И. Метаболически-воспалительная концепция атеротромбоза и новые подходы к терапии больных. *Бюллетень СО РАМН*. 2006;2(120):132–138. [Barkagan Z.S., Kostyuchenko G.I. Metabolicheskii-vozpалitel'naya kontseptsiya aterotromboza i novye podkhody k terapii bolnykh [Metabolic-inflammatory concept of atherothrombosis and new approaches to the treatment of patients]. *Bulleten Sib. otd. Ros. akad. med. nauk [Bull. Siberian branch of the Academy of Med. Sciences]*. 2006;2(120):132–138. (In Russian)].
- Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С. Эпигенетическое действие регуляторных пептидов на цитокиновый профиль и систему гемостаза. *Вестник гематологии*. 2013;9(2):29–33. [Kuznik B.I., Khavinson V.Ch., Tarnovskaya S.I., Linjkova N.S. Epigeneticheskoe deystvie regulatorynykh peptidov na tsitokonoviy profil i sistemu gemostaza [Epigenetic effect of regulatory peptides on cytokine profile and hemostatic system]. *Vestnik gematologii [The Bulletin of Hematology]*. 2013;9(2):29–33. (In Russian)].
- Ковалева О.Н., Кравченко Н.А., Амбросова Т.Н. Метаболический синдром: проблемы диагностики и прогностические критерии. *Внутренняя медицина*. 2008;1(7):1–4. [Kovaleva O.N., Kravchenko N.A., Ambrosova T.N. Metabolicheskii sindrom: problemy diagnostiki i prognosticheskie kriterii [Metabolic syndrome: diagnostic problems and prognostic criteria]. *Vnutrennaya meditsina [Internal Medicine]*. 2008;1(7):1–4. (In Russian)].
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови*. М.: Адвансед Солушнз, 2012. 160 с. [Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A. *Teoreticheskie i prakticheskie voprosy izuchenia funktsionalnogo sostojania protivosvertvayushey sistemy [Theoretical and practical issues of studying the functional state of the blood anticoagulation system]*. Moscow: Advanced Solutions Publ., 2012. 160 p. (In Russian)].
- Мясоедов Н.Ф., Шубина Т.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Андреева Л.А., Ляпина Л.А. Профилактическое гипохолестеринемическое действие регуляторного пептида Pro-Gly-Pro-Leu. *Вопросы питания*. 2013;82(5):41–45. [Myasoedov N.F., Shubina T.A., Obergan T.Y., Grigorjeva M.E., Andreeva L.A., Lyapina L.A. Profilakticheskoe gipokholesterinemicheskoe deystvie regulatorynogo peptida Pro-Gly-Pro-Leu [Preventive hypocholesterolemic effect of regulatory peptide Pro-Gly-Pro-Leu]. *Voprosy pitaniya [Problems of Nutrition]*. 2013;82(5):41–45. (In Russian)].
- Andreeva L.A., Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A. Effect of the PRO-GLY-PRO peptide on hemostasis and lipid metabolism in rats with hypercholesterolemia. *Dokl. Biol. Sci.* 2013;453(1):333–335.
- Chiasson J.L., Josse R.G., Gomis R. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *JAMA*. 2003;290:486–489.
- Chew G.T., Gan S.K., Watts G.F. Revisiting the metabolic syndrome. *MJA*. 2006;185(8):445–449.
- Day K. Metabolic syndrome, or what you will: definitions and epidemiology. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 2007;4(1):32–38.
- Ikee R., Hamasaki Y., Oka M., Maesato K., Mano T., Moriya H., et al. Clinical: High-density lipoprotein cholesterol and left ventricular mass index in peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.* 2008;28:611–616.
- Jiao J., Han S.F., Zhang W., Xu J.Y., Tong X., Yin X.B., et al. Chronic leucine supplementation improves lipid metabolism in C57BL/6J mice fed with a high-fat/cholesterol diet. *Food Nutr. Res.* 2016;60:31–34.
- Ilas J., Hudecz F., Süli-Vargha H., Kikelj D. Peptides and pseudopeptides incorporating D-Phe-Pro-Arg and Arg-Gly-Asp lead sequences as potential antithrombotic agents. *J. Pept. Sci.* 2008;14(8):946–953.
- Kong X., Zhang D.Y., Wu H.B., Li F.X. Losartan and pioglitazone ameliorate nephropathy in experimental metabolic syndrome rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2011;34(5):693–698.
- Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A., Andreeva L.A. Mechanism for glyproline protection in hypercholesterolemia. *Pathophysiol.* 2016;23(1):27–33.
- Preetha P.P., Devi B.G., Rajamohan T. Mature coconut water exhibits antidiabetic and antithrombotic potential via L-arginine-nitric oxide pathway in alloxan induced diabetic rats. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 2015;26(6):575–583.
- Watson T., Arya A., Sulke N., Lip G.Y.H. Antithrombotic therapy: relationship of indices of inflammation and thrombogenesis to arrhythmia burden in paroxysmal arterial fibrillation. *Chest*. 2010;137:869–876.
- Xiao C., Hsieh J., Adeli K., Lewis G.F. Gut-liver interaction in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.* 2011;301:E429–E446.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Оберган Тамара Юрьевна*, к.б.н., ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

e-mail: tobergan@mail.ru

Tamara Yu. Obergan*, Cand. Sci. (Biol.), Lomonosov Moscow State University;

e-mail: tobergan@mail.ru

Ляпина Маргарита Григорьевна, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

e-mail: lyapinarita@gmail.com

Margarita G. Lyapina, Lomonosov Moscow State University;

e-mail: lyapinarita@gmail.com

Григорьева Марина Евгеньевна, к.б.н., ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

Marina E. Grigorjeva, Cand. Sci. (Biol.), Lomonosov Moscow State University;

e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

Ляпина Людмила Анисимовна, д.б.н., проф., ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

e-mail: lyapinal@mail.ru

Lydmila A. Lyapina, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Lomonosov Moscow State University;

e-mail: lyapinal@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ МЫШИ: МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ, МОДЕЛИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОНКОЛОГИИ (ОБЗОР)

О.И. Кит, А.Ю. Максимов, Т.П. Протасова*, А.С. Гончарова, Д.С. Кутилин,
Е.А. Лукбанова

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России
344037, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63

В лабораториях разных стран ведется постоянная работа по улучшению существующих, а также созданию новых биологических объектов, моделирующих различные заболевания человека. Иммунодефицитные мыши, которым трансплантированы функциональные клетки и ткани человека, а также трансгенные животные, в геноме которых интегрированы соответствующие человеческие гены — то есть «гуманизированные мыши», — все чаще выступают в качестве тест-систем в различных биомедицинских исследованиях. Модели гуманизированных мышей постоянно совершенствуются и в настоящее время используются для изучения биологических реакций человека, в качестве доклинических инструментов для тестирования лекарственных средств, для выявления патогенетических механизмов широкого спектра заболеваний. В частности, такие животные играют все более важную роль в изучении специфических для человека инфекционных агентов, а также широко применяются в исследованиях биологии рака и разработках новых противоопухолевых воздействий. Кроме того, гуманизированные мыши все чаще используются в качестве трансляционных моделей во многих областях клинических исследований, включая трансплантологию, иммунологию и онкологию. В конечном счете использование гуманизированных животных может привести к внедрению действительно «персонализированной» медицины в клиническую практику. В данном обзоре обсуждаются современные достижения в получении и использовании гуманизированных мышей, подчеркивается их полезность для изучения патогенеза, а также разработки новых методов лечения онкологических заболеваний человека.

Ключевые слова: гуманизация животных, ксенотрансплантация, иммунодефицитные мыши, моделирование заболеваний человека, злокачественные опухоли

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Кит О.И., Максимов А.Ю., Протасова Т.П., Гончарова А.С., Кутилин Д.С., Лукбанова Е.А. Гуманизированные мыши: методы получения, модели и использование в экспериментальной онкологии (обзор). *Биомедицина*. 2019;15(4):67–81. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-67-81>

Поступила 06.06.2019

Принята после доработки 19.08.2019

Опубликована 10.12.2019

HUMANIZED MICE: CREATION, MODELS AND USE IN EXPERIMENTAL ONCOLOGY (REVIEW)

Oleg I. Kit, Alexey Yu. Maksimov, Tatyana P. Protasova*, Anna S. Goncharova,
Denis S. Kutilin, Ekaterina A. Lukbanova

Rostov Research Institute of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don, 14-ya liniya str., 63

Research laboratories in various countries are constantly endeavouring to improve the existing and to create new biological objects to simulate various human diseases. Immunodeficient mice with transplanted human functional cells and tissues, as well as transgenic animals with the relevant human genes integrated in their genome — i. e. humanized mice — are increasingly used as test systems in biomedical studies. Humanized mouse models are constantly being improved to find application in studies investigating human biological reactions and identifying the pathogenetic mechanisms behind a wide range of diseases, or as preclinical tools for medicine testing. In particular, such animals play an increasingly important role both in studies of human-specific infectious agents, cancer biology research and in the development of new anti-tumour agents. In addition, humanized mice are increasingly used as translational models in many areas of clinical research, including transplantology, immunology and oncology. Ultimately, the use of humanized animals can lead to the introduction of a truly personalized medicine into clinical practice. In this review, we discuss modern advances in the creation and use of humanized mice, emphasizing their usefulness for the pathogenesis study, as well as the development of new methods for human cancer treatment.

Keywords: humanized animals, xenografting, immunodeficient mice, human disease modelling, malignant tumours

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

For citation: Kit O.I., Maksimov A.Yu., Protasova T.P., Goncharova A.S., Kutilin D.S., Lukbanova E.A. Humanized Mice: Creation, Models and Use in Experimental Oncology (Review). *Journal Biomed.* 2019;15(4):67–81. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-67-81>

Submitted 06.06.2019

Revised 19.08.2019

Published 10.12.2019

Введение

Животные модели патологических состояний человека — важнейший, а зачастую и единственный доступный инструмент для исследования альтернативных стратегий лечения и тестирования новых фармакологических субстанций [2]. На современном этапе большой научный интерес представляют т. н. «гуманизированные животные», в организме которых функционируют гены, клетки, ткани или иные органоиды человеческого происхождения [3, 44]. Значительное место при испытаниях фармакологической эффективности и токсичности новых лекарственных средств отводится трансгенным животным, в геном которых целенаправленно интегрированы соответствующие гены человека [4] (генетическая гуманизация [21]). Иммунодефицитные животные, гуманизированные путем приживления трансплантированных клеток и тканей, становятся все более важными в качестве моделей для изучения патогенеза и разработки ме-

тодов лечения различных человеческих заболеваний [44].

Мелких грызунов — крыс и мышей — широко используют в исследованиях ввиду их небольшого размера, простоты содержания и выполнения манипуляций, короткого репродуктивного цикла, генетического и физиологического сходства с людьми. Однако, несмотря на огромное количество фундаментальных исследований, проводимых на мышах, существуют ограничения при изучении биологии человека, т. к. некоторые особенности функционирования мышинных биологических систем существенно различаются с таковыми у людей, особенно их иммунной системой. Например, существует много врожденных различий на молекулярном уровне, включая отсутствие одних веществ в организме мышей и наличие других, которые присущи только человеку. Кроме того, многие лекарства и инфекции являются видоспецифичными для человека, а механизмы иммунных реакций на патогены зачастую значительно отличаются

от таковых в мышинном организме [50]. Эти проблемы подчеркивают актуальность разработки животных моделей, воспроизводящих биологические системы человека.

Гуманизированные мыши начали заполнять этот пробел и стали важным инструментом для доклинических биомедицинских исследований. Это связано с постоянным усовершенствованием иммунодефицитных мышей-реципиентов, используемых для гуманизации в течение последних двух десятилетий. Ключевым моментом стало получение иммунодефицитных мышей с мутациями *IL2rg^{null}*, лежащими в основе отсутствия адаптивного и серьезных недостатков врожденного иммунитета. Благодаря успешному формированию гуманизированной иммунной системы у таких мышей, в отличие от предыдущих моделей, биологические реакции максимально схожи с человеческими [8, 34, 35].

Получение животных с такими характеристиками стало главным достижением в создании иммунодефицитных реципиентов для успешного приживления ксенотрансплантатов. Им могут быть трансплантированы различные человеческие клетки и ткани, такие как островки Лангерганса, фрагменты печени, кожи, а также солидные и гематологические формы рака. Гуманизированные мыши позволяют добиться значительного прогресса в исследованиях инфекционных и онкологических заболеваний человека, аллергических и иммунных реакций в трансплантологии и регенеративной медицине [8, 36, 44].

Каждая из существующих моделей имеет свои преимущества и ограничения, поэтому для исследователей важно выбрать модель, максимально подходящую для решения конкретных, интересующих их научных вопросов. В данном обзоре рассматриваются методы гуманизации лабораторных животных, моделирование онкологических заболеваний человека на гуманизирован-

ных иммунодефицитных мышях, а также применение этих животных-моделей в разработке и доклинической апробации новых способов противоопухолевой терапии.

Методы получения и модели гуманизированных животных

Процесс трансплантации донорского материала обычно включает следующие этапы.

1. Выбор и кондиционирование реципиента.
2. Получение донорских клеток и их подготовка к трансплантации.
3. Процедура инокуляции клеточного материала в организм реципиента.
4. Контроль эффективности трансплантации/приживления донорских клеток.

Выбор реципиента

Имунодефицитные мыши являются наиболее оптимизированным и распространенным объектом для гуманизации и межвидовой ксенотрансплантации [3, 4]. Бестимусным мышам свойственны наличие *B*-лимфоцитов, а также компетентность врожденной иммунной системы, включая *NK*-клетки, которые могут препятствовать как приживлению донорских клеток крови, так и росту ксеногенной опухоли и ее метастазированию.

Трансплантация мышам гематopoэтических клеток человека впервые стала возможной благодаря мутации каталитического липептида, активирующего протеинкиназы ДНК (*Prkdc^{scid}*, или *scid*), обнаруженной у мышей линии *CB17* более 30-ти лет назад. Однако сильная врожденная иммунная система мышей *CB17-scid* препятствовала их эффективной гуманизации [35].

Мыши *scid* с тяжелыми комбинированными иммунодефицитами получили широкое применение, т. к. отсутствие *NK*-клеток и дополнительные врожденные дефекты иммунной системы позволяют успешно прививать этим животным человеческие

кроветворные клетки и опухолевый материал, включая культуры клеток, первичные солидные опухоли и злокачественные клетки крови [10].

В последнее время внимание исследователей сосредоточено на улучшении качества гуманизации мышей за счет снижения уровня врожденного иммунитета, особенно у иммунодефицитных линий *NOD* [35]. Мыши *scid*, а также *Rag1^{null}* и *Rag2^{null}* (с мутациями гена, активирующего рекомбинацию), у которых, кроме прочего, отсутствует субъединица *IL2 γ* , утрачивают адаптивный иммунитет. *IL2 γ ^{null}* — мутация в общей γ -цепи рецепторов для цитокинов *IL2*, *IL4*, *IL7*, *IL9*, *IL15* и *IL21*. В настоящее время распространено использование трех вариантов мышей с иммунодефицитом, связанным с этой мутацией:

1. *NOD.Shi.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Sug — NOG*;
2. *NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl — NSG*;
3. *C:129S4-Rag2tm1 Rg2llg2Rg (BALB/c-Rag или BRG)*.

У мышей *NOG* имеется усеченный цитоплазматический домен γ -цепи, который связывает цитокины, но утрачен сигнальный домен, у *NSG* и *BRG* — γ -цепь отсутствует полностью [8, 34, 35].

Jak3 является тирозинкиназой рецепторного типа, необходимой для передачи сигналов от рецепторов γ -цепи к цитокинам, поэтому *Jak3*-дефицитные мыши проявляют тот же иммунный фенотип, что и животные *IL2 γ ^{null}*. Тем не менее, полученные *Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-}* мыши с разным генетическим фоном — *C57/BL6* и *Balb/c* — демонстрировали разный уровень приживляемости человеческих гематопоэтических стволовых клеток (ГСК) и мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови. Из мышей этих двух линий, имеющих комбинированный дефицит *Rag-2/Jak3*, только *Balb/c*-реципиенты характеризовались эффективным приживлением ксеногенных ГСК и МНК. Однако при подкожной перевивке клеток человеческой эритролейкемии

K562 у мышей обеих линий образовались солидные опухоли практически одинакового размера. Авторами проведенного исследования было заявлено о перспективности применения моделей *Balb/c Rag-2^{-/-}Jak3^{-/-}* и их преимуществах перед иммунодефицитами *NOD/scid*-мышей [23].

При выборе возрастной категории животных для гуманизации — новорожденных (1–5, в крайнем случае 7 сут) или взрослых (от 5 нед.) — исследователи, как правило, руководствуются следующими практическими соображениями:

1. Использование новорожденных имеет ценовое преимущество, т. к. детеныши остаются с родителями до отъема, что снижает расходы на содержание.
2. Дополнительным преимуществом новорожденных мышей является более ранний абсолютный возраст, в котором у них развивается гуманизированная иммунная система (≥ 12 нед. против 17–24 нед. у взрослых мышей).
3. Основным недостатком использования новорожденных реципиентов является необходимость увеличения трудозатрат на обслуживание, включая постоянный контроль за самкой с выводком.
4. Другим недостатком использования новорожденных является необходимость совпадения времени их рождения с наличием человеческого материала, пригодного для трансплантации [24].

Кондиционирование перед трансплантацией донорского материала подразумевает «создание кондиций, т. е. условий в организме реципиента к введению трансплантата». Важнейшим из этих условий является иммуносупрессия, необходимая для предупреждения реакции трансплантата против хозяина, или отторжения иммунной системой реципиента клеток или тканей, поступивших из донорского организма. Иммуносупрессия может быть лучевой (радиационной), химической или комбинированной [1]. Однако обсуждение исполь-

зования химиотерапевтических агентов (например, бусульфана, циклофосфида, др. алкилирующих агентов, применяемых у животных, например, при аллотрансплантациях) выходит за рамки настоящего обзора.

Наше внимание уделено дозам и режимам облучения, которые являются наиболее часто используемым методом миелоабляции у мышей [26]. Перед трансплантацией ксеногенных клеток и тканей в качестве иммуносупрессора, как правило, используют γ -излучение. Дозы применяемых воздействий зависят от веса, возраста и линий животных: мыши-*SCID* более чувствительны к γ -излучению, чем *BALB/c* того же возраста, равно как и новорожденные по отношению к взрослым животным. Например, для кондиционирования новорожденных мышат *BALB/c* используют дозы γ -облучения от 3 до 4 Гр, тогда как взрослых (8–10 недель) — 5 Гр соответственно. Новорожденных мышей *SCID* подвергают облучению в дозах 1–1,5 Гр, взрослых (5–12 нед.) — 2,4–3,5 Гр (табл. 1).

После облучения мышам-реципиентам требуется отдых в течение 4–24 ч перед процедурой ксенотрансплантации [24]. Описан режим кондиционирования новорожденных мышей *BALB/c-Rag-2 /IL2r^{null}* суммарной дозой 4 Гр (по 2 Гр с интервалом 3–4 ч) и с последующим ожиданием в течение 4–12 ч до инокуляции человеческих ГСК [40].

Получение и подготовка донорского материала

С целью формирования функционального гуманизированного иммунитета мышам-реципиентам трансплантируют гематопэтические стволовые клетки (ГСК) и зрелые мононуклеарные клетки (МНК) лейкоцитарного ряда, полученные от людей, а также фрагменты тимуса или печени человеческих эмбрионов.

ГСК получают из нескольких источников: путем аспирации костного мозга, из пуповинной крови, эмбриональной печени, периферической крови (табл. 1).

МНК выделяют из цельной периферической крови, а также из клеточной суспензии лимфатических узлов или селезенки. Каждый реципиент должен получать МНК от отдельного донора [24].

Исходный донорский материал в виде одноклеточной суспензии, содержащей ГСК или МНК, подвергают очистке путем центрифугирования (разделения на фракции и удаления *T*-клеток) и при необходимости — культивированию (размножению с целью получения клеток в количестве, необходимом для трансплантации) [19]. Мононуклеарная фракция может быть выделена с помощью *Ficoll*-градиента, ГСК (иммунофенотип *CD34⁺*) — с помощью позитивной селекции на магнитно-активированном клеточном сепараторе [24].

Сайты для трансплантации

Имплантиацию клеток и тканей человека мышам-реципиентам осуществляют в различные сайты (табл. 1, 2) в зависимости от поставленных исследовательских целей или ввиду объективных ограничений, к которым относятся возраст и размер мышам-реципиента, а также возможность приживления донорского материала.

Так, к эффективному приживлению ГСК приводят инокуляции непосредственно в костномозговую полость или в венозное русло, а также в печень. Внутривенные введения осуществляют преимущественно в латеральную хвостовую вену, однако это возможно только у мышей в возрасте не менее 10–12 недель и массой 18–20 г. Применение инъекций в ретроорбитальный синус, а также в селезенку и в бедренную кость ограничено необходимостью наркотизации животных ввиду высокой инвазивности процедуры [26].

Таблица 1. Некоторые подходы к гуманизации иммунодефицитных мышей
Table 1. Approaches to humanization of immunodeficient mice

№ п/п	Источник	Мыши-реципиенты, возраст	Колонизированные у-излучением	Человеческие клетки / откуда получены	Сайт инокуляции / количество клеток на животное	Оценка эффективности КТ	Дополнения
1	Traggiai E., et al., 2004 [40]	BALB/c-Rag-2/IL2γ ^{null} новорожд. 1–5 дн.	4 Гр за 4–12 ч до КТ	ГСК CD34 ⁺ / пуловинная кровь	печень — (0,5–1)×10 ⁶	ПЦМ	---
2	van Lent A.U., et al., [43]	BALB/c Rag2(-/-) gamma(c)(-/-) новорожд. 1–5 дн.	3–4 Гр	ГСК CD34 ⁺ CD38 ⁺ / пуловинная кровь; эмбриональный, печень	печень — 1×10 ⁵	ПЦМ через 7–8 нед.	лентивирусная трансдукция ГСК
3	Lang J., et al., 2011 [15]	BALB/cRag2 ^{null} /Il2γ ^{null} новорожд. 1–3 дн.	3, 5 Гр	ГСК CD34 ⁺ / пуловинная кровь	печень или лицевая вена — 5×10 ⁴	ПЦМ	---
4	Ono A., et al., 2011 [23]	BALB/c Rag-2-/-Jak3-/- C57BL/6 Rag-2-/-Jak3-/-	4 Гр (новорожд.)	CD34 ⁺ / пуловин. кр.	печень — 1×10 ⁵	ПЦМ	---
			5 Гр. (8–10 нед.)	МК / ПК	в/брюшин. — 2×10 ⁷		
5	Pearson T., et al., 2011 [24]	NOD/Lt-scid IL2γ ^{null} 5–12 нед.	2,4 Гр за 4–24 ч до КТ	CD34 ⁺	хвост. вена — 3×10 ⁴	ПЦМ	---
			Те же, новорожд. 1–2 сут	МК	селезенка — 20×10 ⁶		
				CD34 ⁺ / пуловинная кровь	печень — 3×10 ⁴		
6	Tanaka S., et al., 2013 [39]	NOD/SCID/IL2γ ^{null} (NSG) новорожд. 2 дн.	1, 5 Гр	ГСК CD34 ⁺ / пуловинная кровь	лицевая вена — (1–3)×10 ⁴	ПЦМ	кюфрукты, микроскопия
7	Wang H., et al., 2018 [43]	NOD/SCID ♀ 6 нед.	3, 5 Гр за 4–6 ч до КТ	CD34 ⁺ / пуловинная кровь	хвостовая вена — 1×10 ⁶	---	---
8	Hanazawa A., et al., 2018 [13]	NOD/Sh1ic/scid/IL-2Rγ ^{null} (NOG), NOD/Sh1ic (NOD)	2, 5 Гр за 24 ч до КТ	CD34 ⁺ / пуловинная кровь	внутривенно — 5×10 ⁴	ПЦМ	---

Примечание: КТ — ксенотрансплантация; ГСК — гематopoэтические стволовые клетки; МНК — мононуклеарные клетки; ПК — периферическая кровь; ПЦМ — проточная цитометрия.

Note: КТ — xenotransplantation; ГСК — hematopoietic stem cells; МНК — mononuclear cells; ПК — peripheral blood; ПЦМ — flow cytometry.

Трансплантация ГСК новорожденным мышам требует немного больше времени, ресурсов и технических навыков, чем выполнение аналогичной процедуры у взрослых животных. Можно использовать один из путей инокуляции человеческих клеток: внутривенный (через лицевую вену или внутрисердечно), внутривеннопеченочные, а также внутрибрюшинные инъекции [24].

Перевивку зрелых МНК осуществляют внутривенно, внутрибрюшинно или в селезенку и только взрослым животным (табл. 1, 2). Фрагменты тимуса или печени используют для трансплантации под капсулу почки мыши (модель *BLT*, [44]).

Таким образом, при ксенотрансплантации взрослым животным самыми используемыми являются внутривенные (хвостовая вена), а новорожденным — внутривеннопеченочные и внутривенные (лицевая вена) способы инокуляции клеточных суспензий (табл. 2).

Большую популярность на сегодняшний день получили три гуманизированные модели, созданные на основе иммунодефицитных *IL2rg^{null}* мышей [44].

Первую модель, известную как *Hu-PBL-SCID*, создают путем инъекции МНК периферической крови человека взрослым животным — как правило, внутрибрюшинно, в селезенку или внутривенно. Эта модель характеризуется быстрым при-

живлением *CD3⁺* *T*-лимфоцитов человека к концу первой недели и отлично подходит для изучения функции *T*-клеток человека *in vivo*, но имеет короткое экспериментальное окно из-за развития ксеногенной болезни «трансплантат против хозяина» с летальным исходом примерно через 4–8 недель. Тем не менее, это экспериментальное окно может быть расширено, если использовать реципиентов *NSG*, у которых отсутствует главный комплекс гистосовместимости.

Вторая модель, называемая *Hu-SRC-SCID*, включает внутривенную (IV) или интрафemorальную (в бедренную кость) инъекцию человеческих ГСК *CD34⁺*, полученных из костного мозга, пуповинной крови, эмбриональной печени или из мобилизованной филграстимом периферической крови. Эта модель характеризуется развитием полноценного человеческого лимфопоэза, обеспечивающего полный спектр функционирующих иммунных клеток. Несмотря на то, что *B*-клетки, *T*-клетки, миелоидные клетки и антиген-презентирующие клетки присутствуют в периферических кровяных тканях, уровень гранулоцитов, тромбоцитов и эритроцитов, формирующихся в костном мозге, в периферической крови очень низок.

Третья модель — модель *BLT*, которую получают путем трансплантации фрагмен-

Таблица 2. Сайты для ксенотрансплантации гематopoэтических стволовых клеток (ГСК) и мононуклеарных клеток (МНК) иммунодефицитным мышам

Table 2. Sites for xenotransplantation of hematopoietic stem cells (HSC) and mononuclear cells (MNC) to immunodeficient mice

Клетки	Возраст мышей	Пути введения человеческих клеток в организм мышей-реципиентов							
		хвост. вена	лицевая вена	РО синус	внутрисердеч.	бедрен. кость	печень	брюшина	селезенка
ГСК	н/р	0	++	—	+	0	+++	+	0
	взр.	+++	+	+	0	+	+	0	0
МНК	взр.	++	0	+	0	0	0	+	+

Примечание: н/р — новорожденные; взр. — взрослые; РО — ретроорбитальный; распространенность использования сайта для трансплантации: — — нет сведений; 0 — не используют; + — редко; ++ — часто; +++ — чаще остальных.

Note: n/r — newborn; взр. — adult; PO — retroorbital; frequency of transplantation sites: — — not available; 0 — not used; + — rare; ++ — common; +++ — most common.

тов печени и тимуса эмбриона человека под капсулу почки мыши, а также внутривенной инъекции аутологичных ГСК, полученных из печени плода. В результате, как и в модели *Hu-SRC-SCID*, развиваются все линии человеческих кровяных клеток. Одним из основных ограничений модели *BLT* является, в большинстве случаев, развитие синдрома истощения у мышей, которое сужает временные рамки для экспериментов [44].

Удобным и эффективным **методом оценки прижизнения клеток** человека у гуманизированных мышей является проточная цитометрия (табл. 1). Также в этих целях могут использовать конфокальное микрокопирование [39].

Гуманизированные мыши в исследованиях биологии рака и разработке новых стратегий противоопухолевой терапии

Довольно широко гуманизированные мыши используются в качестве доклинических моделей для исследования биологии опухолей как платформа *in vivo* для выявления и тестирования потенциальных лекарственных мишеней, исследования механизмов метастазирования, а также для оценки безопасности и эффективности новых методов терапии до их поступления в клинику.

Моделирование взаимодействия опухоли и иммунной системы человека у гуманизированных мышей

У мышей с трансплантированными человеческими ГСК и лейкоцитами периферической крови иммунные клетки человека проникают в опухолевое микроокружение подобно тому, что наблюдается в злокачественных новообразованиях пациентов, представляя модель для изучения взаимодействия опухоли и иммунной системы.

Так, новорожденным мышам *NSG*, гуманизированным введением человеческих

ГСК *CD34⁺* (модель *Hu-SRC-SCID*), прививали линейные клетки рака молочной железы. Было отмечено, что *T*-клетки и естественные киллеры (*NK*-клетки) перемещались в микроокружение образовавшихся опухолей. В результате этого органы, пораженные злокачественным процессом, имели более высокое соотношение количества *T*-хелперов (*CD4*) к числу цитотоксических *T*-лимфоцитов (*CD8*), большинство из которых экспрессировали фенотип памяти *CD45RA-CD27⁺* [47]. У *Hu-PBL-SCID*-мышей с новообразованиями, развившимися из того же опухолевого материала, большинство *T*-клеток селезенки и опухоли имели фенотип памяти *CD45RA-* и были представлены популяциями клеток как центральной, так и эффекторной памяти. Большинство туморинфильтрующих лимфоцитов в этом случае являлись эффекторными клетками памяти, в отличие от лимфоцитов центральной памяти, преобладающих в первично перевитых ксенотрансплантатах опухолей, полученных от пациентов (*patient derived xenograft — PDX*) [30].

Микроокружение опухоли содержит миелоидные иммуносупрессорные клетки и ассоциированные с опухолью макрофаги, которые подавляют противоопухолевый иммунитет хозяина и способствуют опухолевому ангиогенезу и метастазированию. Rongvaux A., et al. [27] получили мышей *BRG* с экспрессией человеческих рецепторов, стимулирующих развитие миелоидных клеток (т. н. мышей *MISTRG*). У этих животных с трансплантированными человеческими ГСК фетальной печени и подкожно перевитой клеточной линией меланомы человека *Me290* была отмечена инфильтрация макрофагами микроокружения опухоли подобно тому, что наблюдается в первичных новообразованиях. В результате у мышей *Hu-SRC-SCID MISTRG* опухоли росли значительно лучше, чем у *Hu-SRC-SCID NSG*.

Hanazawa A., et al. [13] создали новый гуманизированный трансгенный штамм мышей NOG, экспрессирующих человеческий интерлейкин-6, — *NOG-hIL-6 Tg*. После трансплантации ГСК человека этим мышам наблюдалась усиленная дифференцировка человеческих макрофагов. Опухоли, образовавшиеся у них в результате перевивки клеток линии *HSC4* (плоскоклеточный рак головы и шеи человека), продуцировали различные факторы, включая *IL-6*, *IL-1 β* , колониестимулирующий фактор макрофагов и фактор роста эндотелия сосудов. Микроокружение опухолей включало человеческие туморассоциированные макрофаги, являющиеся мишенями для иммунотерапии, что определяет перспективу использования мышей *NOG-hIL-6 Tg* в разработке и тестировании таргетных противоопухолевых средств.

Выше подчеркивается важная роль гуманизированных мышей в изучении взаимодействий опухоли и иммунной системы, однако использование клеточных опухолевых линий ограничивает применимость этих моделей. Большим шагом к преодолению этих ограничений было создание гуманизированных моделей с *PDX*.

Трансплантация бестимусным мышам нудам (а в последнее время и генетически модифицированным иммунодефицитным животным) опухолей, полученных от пациентов, стала неотъемлемой составляющей исследовательской платформы *in vivo* для разработки и усовершенствования методов лечения различных онкологических заболеваний [5]. Первично приживленные *PDX* сочетают гетерогенность, отсутствующую в линиях опухолевых клеток, с сохранностью перитуморального микроокружения, которое они все же утрачивают при вторичном переносе вследствие замещения мышинными стромальными клетками [18].

Потенциальная трудность получения достаточной для исследований численности

гуманизированных мышей с *PDX* — это отсутствие необходимого количества аутологичных иммунокомпетентных клеток крови. С целью решения этой проблемы был разработан метод размножения ГСК и МНК *ex vivo*. Мышам *NSG*, реципиентам размноженных *in vitro* человеческих ГСК (т. н. *XactMice*), трансплантировали аутологичные *PDX* плоскоклеточной карциномы головы и шеи. В результате внутри опухолей у *XactMice* были обнаружены человеческие *CD45⁺ CD151⁺* клетки, а перитуморально наблюдалась плотная сеть лимфатических сосудов, возникновение которой объясняется наличием иммунных и стромальных компонентов в микроокружении опухоли [19].

Естественные киллеры и цитокиновая терапия

NK- и *NKT*-клетки опосредуют опухолево-иммунный надзор, а изменения их количества и функций зависят от типа опухолей. Разными исследователями предпринимаются усилия по стимулированию противоопухолевой активности этих клеток, включая использование цитокиновой терапии.

Мышам *NSG* с прививками ГСК инъецировали клеточную линию нейроblastомы и размноженные *ex vivo* *NKT*-клетки человека. В результате *NKT*-клетки были обнаружены в микроокружении опухоли, где они локализовались вместе с туморассоциированными макрофагами. Последние секретировали цитокин *CCL20*, который ингибировал выживание и активность клеток *NKT*, обеспечивая рост опухоли. За счет трансформации *ex vivo* *NKT*-клеток интерлейкином *IL-15* было получено повышение их выживаемости и, как следствие, торможение роста опухоли, демонстрирующее эффективность терапии цитокинами *IL-15* [9].

Иммунотерапия *IL-15* также была использована для увеличения популяции *NK*-клеток у мышей *Hu-SRC NSG*, которым привили рак молочной железы человека [47].

Было обнаружено, что использование низких доз *IL-15* способствует повышению жизнеспособности и размножению человеческих *NK*-клеток *in vivo*, а также снижению приживляемости лейкомиической клеточной линии и увеличению выживаемости подопытных животных [9].

Была исследована эффективность *IL-12* как стимулятора противоопухолевой активности иммунной системы у гуманизированных мышей-опухоленосителей. Соединение антитело-*IL12* (*NHS-IL12*) использовали в сочетании с комплексом антитело-*IL2* (*IL2MAB206*) на мышинной модели *Hu-SRC-SCID* с привитой рабдомиосаркомой [49]. Применение *NHS-IL12/IL2MAB206* способствовало торможению роста опухоли и увеличению выживаемости мышей, а также полной регрессии у 75% животных при длительном лечении. Кроме того, опухоли у мышей, получающих *NHS-IL12*, характеризовались высоким процентом стареющих опухолевых клеток и признаками миогенной дифференцировки, более выраженными у мышей, дополнительно получающих *IL2MAB206* [33].

Редактирование *T*-клеток

Один из механизмов усиления противоопухолевого иммунитета заключается в изменении специфичности *T*-клеток с помощью трансгенного переноса *T*-клеточного рецептора (*TCR*) или химерного рецептора антигена (*CAR*). *CAR*-терапия основана на конструировании рецептора *T*-клеток со специфичностью к антигену, не ограниченному главным комплексом гистосовместимости, что позволяет перенаправить *TCR* на любую выбранную мишень. Хотя терапию нацеливанием *T*-клеток уже используют в клинике, гуманизированные мышинные модели необходимы для оптимизации манипуляций *TCR/CAR* [44].

Адаптивная клеточная терапия — выделение и размножение собственных опу-

холеспецифичных *T*-клеток пациента для реинфузии — показала эффективность в лечении почечно-клеточного рака и меланомы [28]. Однако этот метод имеет потенциальные ограничения для широкого использования: выделить редкую популяцию *T*-клеток очень сложно, а время ожидания, необходимое для их адекватного размножения, неприемлемо для большинства пациентов. Механизмы оптимизации переноса трансгенных специфичных для опухоли *TCR* в *T*-клетки были изучены на моделях гуманизированных мышей. Одной из опасностей использования трансгенных *TCR* является увеличение цитотоксичности вследствие нарушений соединения с эндогенным *TCR* [25].

Были созданы и протестированы на гуманизированных мышях *NSG CAR* против мезотелина для мезотелиомы, *ROR1* — для мантийноклеточной лимфомы, *CD44v6* — для множественной миеломы. Гуманизированные мыши были использованы для сравнения функций и тестирования эффективности костимулирующих доменов *CD27*, *ICOS*, *CD28* и *4-1BB* [39]. *CAR*, включающие костимулирующие домены, точнее нацелены на опухоли, что повышает безопасность терапии с их использованием. Поскольку антигены, обычно используемые в *CAR*-терапии, не являются действительно специфичными для опухоли, Kloss C., et al. [14] создали систему, в которой комбинация двух антигенов была необходима для запуска передачи сигналов *CAR*. Получена молекула *CAR* без костимуляционного мотива, специфичная для одного антигена, тогда как молекула химерного костимуляторного рецептора была создана со специфичностью для второго антигена. *T*-клетки, трансдуцированные обеими молекулами, должны взаимодействовать с клетками, экспрессирующими оба антигена, для запуска оптимальной передачи сигналов, индуцирующих ответ *T*-клеток.

Для устранения гетерогенности экспрессии опухолевого антигена был создан биотинсвязывающий иммунный рецептор авидин, расширяющий идею технологии *CAR*. Внеклеточный авидин соединяется с внутриклеточным сигнальным доменом *TCR*. Затем мыши получают биотинилированные антитела, которые будут связываться с туморассоциированными антигенами, например с *EpCAM*. В модели *Hu-PBL-SCID NSG* у гуманизированных мышей, экспрессирующих биотинсвязывающий рецептор, в результате использования *EpCAM* наблюдалось торможение роста опухолей [42].

С целью получения из человеческих ГСК цитотоксических *T*-клеток, специфичных к опухоли Вильмса 1 (*WT-1*), Najima Y., et al. [22] создали линию трансгенных мышей *NSG*, экспрессирующих молекулы *HLA* класса I. После трансплантации человеческих ГСК у этих мышей в костном мозге и селезенке были обнаружены цитотоксические *CD8⁺* лимфоциты и антигенпрезентирующие клетки. Для оценки *CD8*-специфических ответов трансгенных животных иммунизировали опухолевым пептидом *WT-1*, включая вариант нагрузки этим пептидом дендритных клеток. После иммунизации частота *CD8*-опосредованных ответов на данный антиген в селезенке значительно возрастала. Затем рецептором *WT-1* трансдуцировали ГСК и перевели их новорожденным мышам. Тетрамерные *WT-1-CD8*-антигены находились на мембранах дендритных клеток, а распознающие его цитотоксические *T*-лимфоциты были обнаружены в тимусе, костном мозге и селезенке. В исследованиях *in vitro* эти *CD8*-клетки вырабатывали интерферон- γ , уничтожавший лейкозные клетки-мишени.

Костимуляторное усиление и ингибиторы контрольных точек

Использование рецептора 4-1*BB* в качестве костимуляторного мотива при создании молекул *CAR* с более высокой эффективно-

стью продемонстрировало его потенциал для усиления противоопухолевых *T*-ответов *in vivo*. Препарат *PF-05082566*, созданный на основе моноклональных тел — антагонистов 4-1*BB*, тестировали на противоопухолевую эффективность к полученным из различных клеточных линий злокачественным новообразованиям. Мышам модифицированной модели *Hu-PBL-SCID/Beige* одновременно вводили под кожу злокачественные клетки и МНК. У подопытных животных, получавших *PF-05082566*, ингибирование опухолевого роста составляло 40–60% от контроля, что позволяет предполагать влияние иммуномодуляции агонистов на рост опухолей у людей [11].

Другим механизмом иммуномодуляции является использование ингибиторов контрольных точек — моноклональных антител, относящихся к группе таргетных препаратов. Двумя ингибиторами, имеющими определенный клинический эффект, являются антитела к *T*-лимфоцитарному антигену 4 (*CTLA-4*) — препарат Ипилимумаб, который активирует *T*-клетки, а также антагонист программированной гибели клеток-1 (анти-*PD-1*) — Ниволумаб [20]. Эти препараты на основе моноклональных антител эффективны при лечении меланомы, но не все пациенты отвечают на терапию *CTLA-4* и анти-*PD-1*. Гуманизированных мышей с привитыми опухолями используют для изучения взаимодействий ингибиторов контрольных точек с иммунной системой, а также для тестирования противоопухолевой эффективности и механизмов действия иммуномодулирующих агентов. Так, было установлено, что применение Урелумаба (антагониста *hCD137*) и Ниволумаба значительно уменьшало рост опухолей у мышей *Rag2null IL2rgnull*. Иммунодефицитным животным в одной группе инъекцировали клетки колоректальной карциномы *HT-29* человека и аллогенные МНК, а в другой — трансплантировали *PDX* карциномы желудка и аутологичные

лейкоциты периферической крови. Было установлено, что замедление опухолевого роста связано с увеличением секреции γ -интерферона человеческими T -клетками и уменьшением количества человеческих регуляторных T -клеток в опухолевых ксенотрансплантатах [31].

Одной из основных проблем, связанных с использованием моноклональных антител, является развитие синдрома высвобождения цитокинов. Мышам, гуманизированным человеческими МНК, инъецировали препараты Muromonab-CD3 или TGN1412 (анти-CD28). Под воздействием Muromonab-CD3 у мышей воспроизводились острые клинические симптомы, такие как пилоэрекция, гипомобильность и гипотермия, тогда как животные, получившие инъекции TGN1412, быстро теряли температуру тела и умирали в течение 2–6 ч [7, 48]. Только испытания, проведенные на гуманизированных животных, дали возможность смоделировать разные варианты реагирования человеческой иммунной системы на тестируемые препараты, включая тяжелые последствия «цитокинового шторма».

Заключение

В представленном обзоре освещены различные методологические подходы к гуманизации мышей, используемые современными исследователями. Тем не менее, в случаях моделирования гуманизированной иммунной системы путем ксенотрансплантации клеток и тканей обязательно соблюдение общих условий. К ним относятся: 1) выбор реципиента с максимальным иммунодефицитом; 2) дополнительная имму-

носупрессия (кондиционирование) животного-реципиента; 3) выбор оптимальных сайтов для внедрения определенных человеческих клеток или тканей. Соблюдение этих условий направлено на предотвращение развития реакции «трансплантат против хозяина» и обеспечение достаточного уровня приживляемости человеческого материала.

Также рассмотрена роль гуманизированных мышей-опухоленосителей в изучении биологии и патогенеза рака, в разработке и тестировании новых противоопухолевых воздействий. Показано, что на таких моделях возможно исследовать *in vivo* взаимодействие приживленных опухоли и иммунной системы человека, включая выход злокачественных новообразований из-под иммунного надзора. Использование гуманизированных мышей в экспериментальной онкологии позволило рассмотреть механизмы иммунной модуляции и оценить на доклиническом этапе ее терапевтический потенциал, а также эффективность и безопасность других противоопухолевых средств.

Однако по-прежнему существуют ограничения в применении гуманизированных моделей, т. к. врожденная иммунная система мышей продолжает препятствовать эффективному приживлению человеческого материала. Возможные перспективы решения этой проблемы заключаются в использовании технологий, позволяющих усилить уже существующий иммунодефицит животных путем нокаута определенных генов (например, мышечных генов главного комплекса гистосовместимости), а также трансгенных манипуляций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. *Гематология: национальное руководство* / Под ред. О.А. Рукавицына. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 776 с. [*Gematologiya: nacional'noe rukovodstvo* [*Hematology: national guidelines*]. Ed. by O.A. Rukavitsyn. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 776 p. (In Russian)].
2. Дейкин А.В. Современные подходы и перспективы использования технологии модификации генома при моделировании патологических состояний человека на животных моделях. *Russian scientist*. 2017;2:16–17. [Deykin A.V. Sovremennye podhody

- i perspektivy ispol'zovaniya tekhnologii modifikatsii genoma pri modelirovaniy patologicheskikh sostoyaniy cheloveka na zhivotnykh modelyakh [Modern approaches and prospects of using the technology of genome editing in modeling the pathological conditions of human in animal models]. *Russian scientist*. 2017;2:16–17. (In Russian)].
3. Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;3:4–22. [Karkischenko N.N., Ryabiyh V.P., Karkischenko V.N., Koloskova E.M. Sozdanie gumani-zirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacological and toxicological research (progress, failures and prospects)]. *Bio-medicine*. 2014;3:4–22. (In Russian)].
 4. Каркищенко Н.Н., Капаназде Г.Д., Петрова Н.В. Новая модель оценки избирательной токсичности антибластомных средств на трансгенных мышах с генами Nat1 hom человека. *Биомедицина*. 2015;3:4–19. [Karkischenko N.N., Kapanadze G.D., Petrova N.V. Novaya model' ocenki izbiratel'noy toksichnosti antiblastomnykh sredstv na transgennykh myshakh s genami Nat1 hom cheloveka [A new model for the evaluation of selective toxicity of antineoplastic funds in transgenic mice with human genes Nat1hom]. *Biomedicine*. 2015;3:4–19. (In Russian)].
 5. Кит О.И., Колесников Е.Н., Максимов А.Ю., Протасова Т.П., Гончарова А.С., Лукбанова Е.А. Методы создания ортотопических моделей рака пищевода и их применение в доклинических исследованиях. *Современные проблемы науки и образования*. 2019;2. [Kit O.I., Kolesnikov E.N., Maksimov A.Yu., Protasova T.P., Goncharova A.S., Lukbanova E.A. Metody sozdaniya ortotopicheskikh modelej raka pishchevoda i ih primeneniye v doklinicheskikh issledovaniyakh [Methods of creation and application of orthotopic models of esophageal cancer in preclinical studies (literature review)]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education]. 2019;2. (In Russian)].
 6. Banuelos S.J., Shultz L.D., Greiner D.L., Burzenski L.M., Gott B., Lyons B.L., et al. Rejection of human islets and human HLA-A2.1 transgenic mouse islets by alloreactive human lymphocytes in immunodeficient NOD-scid and NOD-Rag1(null) Prfl(null) mice. *Clin. Immunol*. 2004;112:273–283. PubMed: 15308121.
 7. Brady J.L., Harrison L.C., Goodman D.J., Cowan P.J., Hawthorne W.J., et al. Preclinical screening for acute toxicity of therapeutic monoclonal antibodies in a hu-SCID model. *Clin. Transl. Immunology*. 2014;3:e29. PubMed: 25587392.
 8. Brehm M.A., Bortell R., Verma M., Shultz L.D., Greiner D.L. Humanized Mice in Translational Immunology. In: *Translational Immunology: Mechanisms and Pharmacological Approaches*. Ed. by S.L. Tan. Elsevier, 2016:285–326.
 9. Cany J., van der Waart A.B., Tordoir M., Franssen G.M., Hangalapura B.N., et al. Natural killer cells generated from cord blood hematopoietic progenitor cells efficiently target bone marrow-residing human leukemia cells in NOD/SCID/IL2Rg(null) mice. *PLoS ONE*. 2013;8:e64384. PubMed: 23755121.
 10. Cassidy J.W., Caldas C., Bruna A. Maintaining Tumor Heterogeneity in Patient-Derived Tumor Xenografts. *Cancer Res*. 2015;75:2963–2968. PubMed: 26180079.
 11. Fisher T.S., Kamperschroer C., Oliphant T., Love V.A., Lira P.D., et al. Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes anti-tumor activity. *Cancer Immunol. Immunother*. 2012;61:1721–1733. PubMed: 22406983.
 12. Fujii H., Trudeau J.D., Teachey D., Fish J.D., Grupp S.A., Schultz K.R., et al. *In vivo* control of acute lymphoblastic leukemia by immunostimulatory CpG oligonucleotides. *Blood*. 2007;109:2008–2013. PubMed: 17068155.
 13. Hanazawa A., Ito R., Katano I., Kawai K., Goto M., Suemizu H., et al. Generation of human immunosuppressive Myeloid cell Populations in human interleukin-6 Transgenic NOG Mice. *Front. Immunol*. 2018;9:152. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00152.
 14. Kloss C.C., Condomines M., Cartellieri M., Bachmann M., Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T-cells. *Nat. Biotechnol*. 2013;31:71–75. PubMed: 23242161.
 15. Lang J., Weiss N., Freed B.M., Torres R.M., Raul M.T., Pelanda R. Generation of hematopoietic humanized mice in the newborn BALB/c-Rag2nullIl2rnull mouse model: a multivariable optimization approach. *Clin. Immunol*. 2011 July;140(1):102–116. DOI: 10.1016/j.clim.2011.04.002.
 16. Lim W.H., Kireta S., Russ G.R., Coates P.T. Human plasmacytoid dendritic cells regulate immune responses to Epstein — Barr virus (EBV) infection and delay EBV-related mortality in humanized NOD-SCID mice. *Blood*. 2007;109:1043–1050. PubMed: 17018863.
 17. Liu D., Song L., Wei J., Courtney A.N., Gao X., et al. IL-15 protects NKT cells from inhibition by tumor-associated macrophages and enhances antimetastatic activity. *J. Clin. Invest*. 2012;122:2221–2233. PubMed: 22565311.
 18. Maykel J., Liu J.H., Li H., Shultz L.D., Greiner D.L., Houghton J. NOD-scidIl2rg (tm1Wjl) and NOD-Rag1 (null) Il2rg (tm1Wjl): a model for stromal cell-tumor cell interaction for human colon cancer. *Dig. Dis. Sci*. 2014;59:1169–1179. PubMed: 24798995.
 19. Morton J.J., Bird G., Keysar S.B., Astling D.P., Lyons T.R., et al. XactMice: humanizing mouse bone

- marrow enables microenvironment reconstitution in a patient-derived xeno-graft model of head and neck cancer. *Oncogene*. 2016;35:290–300. PubMed: 25893296.
20. Mullard A. New checkpoint inhibitors ride the immunotherapy tsunami. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013;12:489–492. PubMed: 23812256.
 21. Murphy A.J., Macdonald L.E., Stevens S., Karow M., Dore A.T., Pobursky K, et al. Mice with megabase humanization of their immunoglobulin genes generate antibodies as efficiently as normal mice. *PNAS*. 2014;111(14):5153–5158. DOI: 10.1073/pnas.1324022111.
 22. Najima Y., Tomizawa-Murasawa M., Saito Y., Watanabe T., Ono R., et al. Induction of WT1-specific human CD8+ T-cells from human HSCs in HLA class I Tg NOD/SCID/IL2rgKO mice. *Blood*. 2016;127:722–734. PubMed: 26702062.
 23. Ono A., Hattori S., Kariya R., Iwanaga S., Taura M., Harada H., et al. Comparative Study of Human Hematopoietic Cell Engraftment into Balb/c and C57BL/6 Strain of Rag-2/Jak3 Double-Deficient Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;539748:6. DOI: 10.1155/2011/539748.
 24. Pearson T., Greiner D.L., Shultz L.D. Creation of “Humanized” Mice to Study Human Immunity. *Curr. Protoc. Immunol.* 2008; CHAPTER: Unit-15.21. DOI: 10.1002/0471142735.im1521s81.
 25. Provasi E., Genovese P., Lombardo A., Magnani Z., Liu P.Q., et al. Editing T-cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat. Med.* 2012;18:807–815. PubMed: 22466705.
 26. Raimon D.-S., Robert C.D. Principles of Bone Marrow Transplantation (BMT): Providing Optimal Veterinary and Husbandry Care to Irradiated Mice in BMT Studies. *J. of the Am. Association for Laboratory Animal Science*. 2009;48(1):11–22.
 27. Rongvaux A., Willinger T., Martinek J., Strowig T., Gearty S.V., et al. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat. Biotechnol.* 2014;32:364–372. PubMed: 24633240.
 28. Rosenberg S.A., Restifo N.P., Yang J.C., Morgan R.A., Dudley M.E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2008;8:299–308. PubMed: 18354418.
 29. Rosfjord E., Lucas J., Li G., Gerber H.P. Advances in patient-derived tumor xeno-grafts: from target identification to predicting clinical response rates in oncology. *Biochem. Pharmacol.* 2014;91:135–143. PubMed: 24950467.
 30. Roth M.D., Harui A. Human tumor infiltrating lymphocytes cooperatively regulate prostate tumor growth in a humanized mouse model. *J. Immunother. Cancer*. 2015;3:12. PubMed: 25901284.
 31. Sanmamed M.F., Rodriguez I., Schalper K.A., Onate C., Azpilikueta A., et al. Nivolumab and Urelumab Enhance Antitumor Activity of Human T-Lymphocytes Engrafted in Rag2-/-IL2Rgammanull Immunodeficient Mice. *Cancer. Res.* 2015;75:3466–3478. PubMed: 26113085.
 32. Shankavaram U.T., Bredel M., Burgan W.E., Carter D., Tofilon P., Camphausen K. Molecular profiling indicates orthotopic xenograft of glioma cell lines simulate a subclass of human glioblastoma. *J. Cell. Mol. Med.* 2012;16:545–554. PubMed: 21595825.
 33. Schilbach K., Alkhaled M., Welker C., Eckert F., Blank G., et al. Cancer-targeted IL-12 controls human rhabdomyosarcoma by senescence induction and myogenic differentiation. *Oncoimmunology*. 2015;4:e1014760. PubMed: 26140238.
 34. Shultz L.D., Brehm M.A., Garcia-Martinez J.V., Greiner D.L. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat. Rev. Immunol.* 2012;12:786–798. PubMed: 23059428.
 35. Shultz L.D., Goodwin N., Ishikawa F., Hosur V., Lyons B.L., Greiner D.L. Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014:694–708. PubMed: 24987146.
 36. Shultz L.D., Ishikawa F., Greiner D.L. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;7:118–130. PubMed: 17259968.
 37. Song D.G., Powell D.J. Pro-survival signaling via CD27 costimulation drives effective CAR T-cell therapy. *Oncoimmunology*. 2012;1:547–549. PubMed: 22754782.
 38. Strowig T., Gurer C., Ploss A., Liu Y.F., Arrey F., et al. Priming of protective T-cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *J. Exp. Med.* 2009;206:1423–1434. PubMed: 19487422.
 39. Tanaka S., Saito Y., Kunisawa J., Kurashima Y., Wake T., Suzuki N., et al. Development of Mature and Functional Human Myeloid Subsets in Hematopoietic Stem Cell-Engrafted NOD/SCID/IL2ryKO Mice. *Immunol.* 2012;188(12):6145–6155. DOI: 10.4049/jimmunol.1103660.
 40. Traggiai E., Chicha L., Mazzucchelli L., Bronz L., Piffaretti J.C., Lanzavecchia A., et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science*. 2004;304:104–107. PubMed: 15064419.
 41. Turgeon N.A., Banuelos S.J., Shultz L.D., Lyons B.L., Iwakoshi N., Greiner D.L., et al. Alloimmune injury and rejection of human skin grafts on human peripheral blood lymphocyte-reconstituted nonobese diabetic severe combined immunodeficient beta2-microglobulin-null mice. *Exp. Biol. Med.* 2003;228:1096–1104.
 42. Urbanska K., Lanitis E., Poussin M., Lynn R.C., Gavin B.P., et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Res.* 2012;72:1844–1852. PubMed: 22315351.
 43. van Lent A.U., Centlivre M., Nagasawa M., Kar-rich J.J., Pouw S.M., Weijer K., et al. *In Vivo* Modulation of Gene Expression by Lentiviral Transduction in

- “Human Immune System” Rag2^{-/-}c^{-/-} Mice. *Methods Mol. Biol.* 2010;595:87–115. DOI: 10.1007/978-1-60761-421-0_6.
44. Walsh N., Kenney L., Jangalwe S., Aryee K.-E., Greiner D.L., Brehm M.A., et al. Humanized mouse models of clinical disease. *Annu. Rev. Pathol.* 2017;12:187–215. DOI: 10.1146/annurev-pathol-052016-100332.
45. Wang H., Ge W., Zhuang Y., Fu J., Li D., Ju X. Fast recovery of platelet production in NOD/SCID mice after transplantation with *ex vivo* expansion of megakaryocyte from cord blood CD34⁺ cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics.* 2018;14(1):233–239. DOI: 10.4103/0973-1482.193893.
46. Wang L.X., Kang G., Kumar P., Lu W., Li Y., et al. Humanized-BLT mouse model of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111:3146–3141. PubMed: 24516154.
47. Wege A.K., Ernst W., Eckl J., Frankenberger B., Vollmann-Zwerenz A., et al. Humanized tumor mice—A new model to study and manipulate the immune response in advanced cancer therapy. *Int. J. Cancer.* 2011;129:2194–2206. PubMed: 21544806.
48. Weissmuller S., Kronhart S., Kreuz D., Schnierle B., Kalinke U., et al. TGN1412 Induces Lymphopenia and Human Cytokine Release in a Humanized Mouse Model. *PLoS ONE.* 2016;11:e0149093. PubMed: 26959227.
49. Zhao Y., Moon E., Carpenito C., Paulos C.M., Liu X., et al. Multiple injections of electroporated autologous T-cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res.* 2010;70:9053–9061. PubMed: 20926399.
50. Zschaler J., Schlorke D., Arnhold J. Differences in innate immune response between man and mouse. *Crit. Rev. Immunol.* 2014;34:433–454. PubMed: 25404048.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кит Олег Иванович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, Заслуженный врач РФ, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России;
e-mail: onko-sekretar@list.ru

Максимов Алексей Юрьевич, д.м.н., проф., ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России;
e-mail: rnioi@list.ru

Протасова Татьяна Пантелеевна*, к.б.н., ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России;
e-mail: protasovatp@yandex.ru

Гончарова Анна Сергеевна, к.б.н., ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России;
e-mail: fateyeva_a_s@list.ru

Кутилин Денис Сергеевич, к.б.н., ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России;
e-mail: k.denees@yandex.ru

Лукбанова Екатерина Алексеевна, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России;
e-mail: katya.samarskaya@yandex.ru

Oleg I. Kit, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Honored Doctor of the Russian Federation, Rostov Research Institute of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: onko-sekretar@list.ru

Alexey Yu. Maksimov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Rostov Research Institute of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: rnioi@list.ru

Tatyana P. Protasova*, Cand. Sci. (Biol.), Rostov Research Institute of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: protasovatp@yandex.ru

Anna S. Goncharova, Cand. Sci. (Biol.), Rostov Research Institute of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: fateyeva_a_s@list.ru

Denis S. Kutilin, Cand. Sci. (Biol.), Rostov Research Institute of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: k.denees@yandex.ru

Ekaterina A. Lukbanova, Rostov Research Institute of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: katya.samarskaya@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



МЕТОДОЛОГИЯ СОВМЕСТНОГО АНАЛИЗА ОДНОВРЕМЕННО ПРОТЕКАЮЩИХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

С.В. Оковитый¹, Н.В. Петрова², Е.Б. Шустов^{1,3,*}, М.А. Белых¹, Н.В. Кириллова¹,
О.М. Спасенкова¹, А.Г. Иванов¹, А.В. Караваева¹, Д.Ю. Ивкин¹, Ю.В. Фокин²,
Е.Л. Матвеевко², О.В. Алимкина²

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

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

² ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий

Федерального медико-биологического агентства России»

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

³ ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

192019, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

В статье выполнен анализ подходов к оценке совместного влияния одновременно реализующихся различных патологических процессов, которые могут формировать синдром «взаимного утяжеления». В медицине экстремальных состояний в качестве примеров таких процессов могут выступать одновременное воздействие гипоксии и гипертермии (горно-пустынная местность), гипоксии и низких температур (условия высокогорья, горные станции в Антарктиде), интенсивных физических нагрузок и эндогенной или комбинированной гипертермии (работа в изолирующем снаряжении или в условиях влажных тропиков), дыхания специализированными гипоксическими гелий-кислородными газовыми смесями в условиях гипербарии и глубоководных погружений, воздействие невесомости и вестибулярных нагрузок во время космических полетов и др. В клинической практике подобные состояния могут называться феноменом коморбидности, если патологические процессы взаимосвязаны едиными звеньями патогенеза, или феноменом полиморбидности, если патогенетическая связь между ними не выявляется. Показано, что клинические методы оценки коморбидности не могут быть перенесены на доклинические исследования, выполняемые с участием лабораторных животных. Представлена методология экспериментальной оценки взаимодействия двух моделируемых патологических процессов на одной группе животных, реализуемая по схеме двухфакторного эксперимента. Показано, что феномен «взаимного утяжеления» будет проявляться значимым взаимодействием между контролируемыми факторами и требует наличия аддитивного или супрааддитивного эффекта по ключевым параметрам экспериментальной модели. Реализуемость такого подхода проверена экспериментально на примере оценки взаимодействия двух независимых модельных процессов — хронической периодической умеренной нормобарической гипоксии, типичной для сонного апноэ, и неалкогольной жировой болезни печени. Установлено, что моделируемые процессы в основном реализуются как независимые факторы. Высококалорийное липидно-углеводное питание вызывает преимущественную перестройку углеводного обмена в тканях и оказывает частичное антагонистическое воздействие на метаболические проявления хронического гипоксического воздействия.

Ключевые слова: биомоделирование, аддитивность, двухфакторный эксперимент, интермиттирующая гипоксия, стеатоз печени

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Оковитый С.В., Петрова Н.В., Шустов Е.Б., Белых М.А., Кириллова Н.В., Спасенкова О.М., Иванов А.Г., Караваева А.В., Ивкин Д.Ю., Фокин Ю.В., Матвеевко Е.Л., Алимкина О.В. Методология совместного анализа одновременно протекающих патологических процессов у лабораторных животных. *Биомедицина*. 2019;15(4):82–97. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-82-97>

Поступила 27.05.2019

Принята после доработки 08.08.2019

Опубликована 10.12.2019

METHODOLOGY OF JOINT ANALYSIS OF CONCURRENT PATHOLOGICAL PROCESSES IN LABORATORY ANIMALS

Sergey V. Okovitiy¹, Nataliya V. Petrova², Evgeniy B. Shustov^{1,3,*}, Mariya A. Belykh¹,
Nadezhda V. Kirillova¹, Ol'ga M. Spasenkova¹, Aleksey G. Ivanov¹, Anna V. Karavaeva¹,
Dmitriy Yu. Ivkin¹, Yuriy V. Fokin², Elena L. Matveyenko², Oksana V. Alimkina²

¹ Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health
of the Russian Federation

197376, Russian Federation, Saint Petersburg, Professora Popova str., 14A

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

³ Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Bekhtereva str., 1

This article sets out to analyze possible approaches to assessing the joint effect of simultaneously occurring and mutually aggravating pathological processes. In medicine of extreme environments, such examples include the joint effect of hypoxia and hyperthermia (desert mountain environments); hypoxia and low temperatures (high altitude locations, mountain stations in Antarctica); intense physical exertion and endogenous or combined hyperthermia (work in insulating protective equipment or in humid tropics); respiration using specialized hypoxic helium-oxygen gas mixtures under the conditions of hyperbaria and deep-sea dives; exposure to weightlessness and vestibular loads during spaceflight; etc. In clinical practice, such conditions may be referred either to the phenomenon of comorbidity, when the pathological processes have common pathogenesis links, or to the phenomenon of polymorbidity, when there is no clear pathogenetic link between the processes. This research shows that clinical methods currently used for assessing comorbidity cannot be directly applied in preclinical studies performed with the participation of laboratory animals. A methodology for assessing the interaction of two experimentally simulated pathological processes in one group of animals based on a two-factorial experiment is presented. It is shown that the phenomenon of mutual aggravation is manifested through a significant interaction between the controlled factors, thus requiring an additive or supra-additive effect according to the key parameters of the experimental model. The feasibility of the proposed approach was tested experimentally by evaluating the interaction of two independent simulated processes, i.e. chronic periodic moderate normobaric hypoxia (typical of sleep apnea) and non-alcoholic fatty liver disease. It was established that the simulated processes are mainly realized as independent factors. High-calorie lipid-carbohydrate nutrition causes a predominant rearrangement of carbohydrate metabolism in the tissues and has a partial antagonistic effect on the metabolic manifestations of chronic hypoxic effects.

Keywords: biomodelling, additivity, two-factorial experiment, intermittent hypoxia, liver steatosis

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

For citation: Okovitiy S.V., Petrova N.V., Shustov E.B., Belykh M.A., Kirillova N.V., Spasenkova O.M., Ivanov A.G., Karavaeva A.V., Ivkin D.Yu., Fokin Yu.V., Matveyenko E.L., Alimkina O.V. Methodology of Joint Analysis of Concurrent Pathological Processes in Laboratory Animals. *Journal Biomed.* 2019;15(4):82–97. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-82-97>

Submitted 27.05.2019

Revised 08.08.2019

Published 10.12.2019

Введение

В современной медицине достаточно часто описываются ситуации одновременного присутствия у одного человека нескольких патологических процессов. В медицине экстремальных состояний в качестве примеров таких процессов могут выступать одновременное воздействие гипоксии и гипертермии (горно-пустынная местность), гипоксии и низких температур (условия высокогорья, горные станции в Антарктиде), интенсивных физических нагрузок и эндогенной или комбинированной гипертермии (работа в изолирующем снаряжении или в условиях влажных тропиков), дыхания специализированными гипоксическими гелий-кислородными газовыми смесями в условиях гипербарии и глубоководных погружений, воздействие невесомости и вестибулярных нагрузок во время космических полетов и др. В клинической практике подобные ситуации являются типичными для больных, госпитализированных в многопрофильные стационары. Так, в исследовании [23] было показано, что около половины пожилых пациентов с артритом имеют артериальную гипертензию, 20% — сердечно-сосудистые заболевания, а 14% — сахарный диабет типа 2. Более 60% пациентов с бронхиальной астмой указали на сопутствующий артрит, 20% — на сердечно-сосудистые заболевания и 16% — на сахарный диабет типа 2. При развитии терминальной почечной недостаточности, требующей заместительной терапии, частота хронических форм ИБС составляет 24,8%, а инфаркта миокарда — 8,7% [21]. В исследовании [22], включавшем 483 больных ожирением, было установлено, что около 75% пациентов имели сопутствующие заболевания, которыми в большинстве случаев являлись дислипидемия, артериальная гипертензия и сахарный диабет типа 2. Примечателен тот факт, что среди молодых пациентов с ожирением (18–29 лет) более двух хро-

нических заболеваний имели 22% мужчин и 43% женщин.

Необходимо учитывать, что при наличии нескольких одновременно выявляемых заболеваний их лечение требует назначения большого числа разноплановых по своим механизмам действия и фармакокинетике препаратов, что ведет к развитию полипрагмазии и непрогнозируемым вариантам лекарственного взаимодействия, существенно влияющим на эффективность и безопасность проводимой фармакотерапии. В то же время крайне затруднительной является и доклиническая оценка лекарственного взаимодействия в условиях одновременно протекающих патологических процессов. Тем самым разработка схем терапии подобных состояний остается эмпирической и зачастую не соответствует требованиям доказательной медицины.

Анализируя подобные ситуации, в 1970 г. A.R. Feinstein предложил понятие «коморбидность». Явление коморбидности было продемонстрировано на примере соматических больных острой ревматической лихорадкой, для которых худший прогноз был установлен для пациентов, страдающих одновременно несколькими заболеваниями [25]. В настоящее время под **коморбидностью** (с лат. *co* — вместе; *morbus* — болезнь) понимают наличие у пациента нескольких хронических заболеваний, связанных между собой общими звеньями патогенетического механизма. Близким, но различающимся по смыслу является понятие **полиморбидность**, характеризующее наличие у пациента нескольких независимых друг от друга заболеваний, не связанных друг с другом патогенетическими механизмами [10].

По российским данным, основанным на материалах патологоанатомических секций (n=3239) больных соматической патологией, поступивших в многопрофильный стационар по поводу декомпенсации хронического заболевания, частота наличия

нескольких патологических процессов составляет 94,2%. Наиболее часто встречались комбинации из двух и трех нозологий, но в единичных случаях (до 2,7%) у одного пациента могли встречаться до 6–8 болезней одновременно [1, 2].

Значимость коморбидности для клинической практики наглядно подчеркивается результатами исследования [30], в котором показано, что выживаемость пациентов с различными стадиями рака различается в зависимости от наличия или отсутствия коморбидности. На первой стадии рака выживаемость при наличии коморбидности составляет 17%, а при ее отсутствии — 83%, на второй — 14 и 76%, на третьей — 28 и 66%, а на четвертой — 0 и 50% соответственно.

В современной клинической практике существуют несколько общепризнанных методов измерения коморбидности, основанных на анализе количества и тяжести хронических заболеваний в структуре коморбидного статуса пациентов [24]. Все они основываются на различных балльных оценках тяжести основного и сопутствующего заболевания, на основе чего определяется доля сопутствующей патологии в тяжести состояния пациента. Необходимо учитывать, что коморбидность не может пониматься как результат сложения того или иного количества болезней и автоматического утяжеления состояния больного, для нее необходимо выявление новых существенных сторон взаимодействия организма и его болезней [14].

Действующая в настоящее время парадигма доказательной медицины предполагает широкую проверку теоретических концепций на лабораторных животных с последующей статистической обработкой полученных результатов. Однако в обширной литературе по методологии биомедицинских (доклинических) исследований нам не удалось найти подходов, в полной мере применимых к доклиническому изучению

феномена взаимного утяжеления при одновременном присутствии нескольких патологических процессов [18]. Причем даже принятые в клинической практике индексы оценки коморбидности не могут быть использованы в биомедицинских исследованиях в связи с практической невозможностью выявления нескольких необходимых для исследования заболеваний на одних и тех же лабораторных животных.

В связи с этим **целью** настоящей работы было разработать теоретические основы методологии оценки синдрома взаимного утяжеления и проверить ее реализацию на примере оценки совместного влияния двух независимых патологических процессов, воздействующих на одних и тех же лабораторных животных.

Теоретические основы методологии оценки взаимодействия патологических процессов на лабораторных животных

В биомедицинских исследованиях относительно просто могут моделироваться три вида взаимодействия патологических процессов — причинный, осложненный и ятрогенный. Для этого может быть применена фактически любая экспериментальная модель формирования изучаемой патологии, и задача исследователя будет сводиться к анализу динамики признаков анализируемых патологических процессов и их осложнений в ходе моделирования (причинный и осложненный виды взаимодействия) или на этапе лечения (для оценки ятрогенного взаимодействия). Так, для оценки причинного вида взаимодействия сахарного диабета и артериальной гипертензии необходимо будет в лонгитюдном исследовании у крыс с моделируемым сахарным диабетом (например, при использовании стрептозотоциновой модели сахарного диабета типа 1) обеспечить периодическое определение систолического

артериального давления у животных любым доступным экспериментатору методом. Подтверждением причинного вида взаимодействия этих патологических процессов будет статистически достоверное повышение уровня артериального давления, начиная с определенных сроков исследования.

Намного сложнее обстоит дело в ситуации необъясненного взаимодействия, существование которого теоретически возможно, но экспериментально еще не подтверждено. Основная сложность в данной ситуации связана с необходимостью моделирования на одной из групп животных совместного воздействия обоих изучаемых патологических процессов.

С методической точки зрения моделирование двух патологических процессов может быть последовательным или одновременным (параллельным). При последовательном процессе вначале проводится моделирование наиболее сложно и медленно формируемого стойкого, практически необратимого патологического состояния (например, ХСН, сахарного диабета, метаболического синдрома, опухолевого роста, аутоиммунного процесса и т. д.). У животных, у которых формирование этого фонового патологического процесса завершено и наличие требуемого патологического состояния верифицировано, в дальнейшем проводится моделирование второго, более быстро формируемого патологического процесса. При этом необходимо не только в динамике отслеживать маркерные показатели как первого, так и второго патологического состояния, но и использовать максимально широкий комплекс исследуемых параметров по разным функциональным системам организма, т. к. заранее предсказать, в отношении какой функциональной или метаболической системы может возникнуть взаимодействие изучаемых патологических процессов, не является возможным.

При одновременном (параллельном) способе моделирования предпочтительным является использование специализированных линий животных, являющихся генетической моделью фонового патологического процесса. Так, при исследовании коморбидности сахарного диабета типа 2 могут быть использованы мыши диабетической линии $B/Ks-Lepr^{db/+}$ (db/db), дефектные по рецептору лептина. При исследовании коморбидности по метаболическому синдрому могут быть использованы взрослые мыши линий NZB и CC57B₆, для которых характерны висцеральное ожирение, дислипидемия, гипергликемия и инсулинорезистентность [5], или крысы линии fa/fa Zucker fatty rats (ZFR) [12]. При исследовании коморбидности гипертензивных состояний могут быть использованы крысы линии SHR, для которых характерна спонтанная гипертензивная реакция. Появление в настоящее время специализированных гуманизированных линий животных, несущих определенные ключевые гены человека (например, гены ферментов систем детоксикации ксенобиотиков NAT и CYP, антигенов главного комплекса гистосовместимости (HLA) и др.), позволяет максимально приблизить результаты доклинических исследований к клинической практике [6–9].

Эта же схема (параллельного моделирования) изучения коморбидности может быть использована в ситуациях, когда оценивается возможное взаимодействие относительно быстро формируемых различных метаболических состояний или патологических процессов при хроническом воздействии ксенобиотиков в нетоксичных дозах, с патологическими процессами, вызываемыми воздействием различных физических (гипоксия, гипотермия, гипертермия, гипероксия, электромагнитные воздействия и др.) и сенсорно-стрессовых (измененные режимы светопериодичности, болевые, шумовые и др.) воздействия.

Вне зависимости от выбора последовательности моделирования общая схема исследования должна строиться на принципах двухфакторного дисперсионного эксперимента. Каждый из моделируемых патологических процессов при этом рассматривается как независимый контролируемый фактор (А, В), который должен быть представлен в минимальном варианте двумя состояниями (есть или нет), а в оптимальном — на трех уровнях выраженности (низкий, средний, высокий). Число экспериментальных групп при этом равно произведению градаций контролируемых факторов. В минимальном варианте таких групп должно быть 4: интактная (А0В0), с моделированием заболевания А (А1В0), с моделированием заболевания В (А0В1) и совместного моделирования обоих заболеваний (А1В1). В каждой группе должно быть равное число животных, не меньше шести.

Статистическая обработка полученных результатов методом двухфакторного дисперсионного анализа позволит оценить влияние каждого из контролируемых факторов, их взаимодействия, а также случайных факторов на маркерные показатели выраженности патологических процессов. Мерой такого влияния может рассматриваться коэффициент детерминации (D) модели, показывающий, какая доля общей дисперсии анализируемого показателя может быть связана с контролируемыми (и их взаимодействием) или случайными факторами. Статистическая достоверность оценки влияния осуществляется по F-критерию для фактического числа степеней свободы.

Особое значение играет фактор взаимодействия (А*В) двух контролируемых факторов. Для того чтобы два патологических процесса (моделируемых заболевания) проявляли свойства патогенетической связности, необходимо, чтобы это взаимодействие было значимым и статистически достоверным. При этом результат такого взаимодей-

ствия может проявляться как дополняющий эффект, суммация, потенцирование или антагонизм.

Отсутствие достоверного взаимодействия контролируемых факторов свидетельствует о том, что они оказывают влияние на животных независимо друг от друга. Это означает, что между их процессами патогенеза нет общих звеньев, и вместо коморбидности имеет место феномен полиморбидности (невзаимодействующих, но одновременно присутствующих патологических процессов). При этом результат такого взаимодействия может проявляться как дополняющий эффект, суммация или антагонизм, но не потенцирование, для которого необходимо взаимодействие между факторами.

Следующим этапом анализа показателей, для которых выявлено достоверное взаимодействие двух патологических процессов, должен стать анализ на аддитивность взаимодействия. Для этого на основе среднегрупповых данных рассчитываются значения эффектов воздействия факторов А и В, а также эффект совместного их воздействия (А*В). Индекс аддитивности (ИА) определяется как отношение эффекта суммарного воздействия А*В к сумме эффектов А и В. Для аддитивного взаимодействия при однонаправленности эффектов расчетные значения ИА должны находиться в диапазоне от 0,9 до 1,1, а если они превышают 1,1, то выявленное взаимодействие будет носить супрааддитивный, потенцирующий характер. Именно такие значения (ИА>0,9) количественной оценки взаимодействия будут характерны для случаев коморбидности. В случае разнонаправленных эффектов обычно результатом взаимодействия является полный или частичный антагонизм, но в некоторых случаях может также встречаться усиление действия одного из факторов (извращенная реакция антагонизма, при которой действие второго фактора игнорируется организмом).

Экспериментальная оценка реализации предлагаемой методологии исследования взаимодействия двух патологических процессов

В качестве двух независимых патологических процессов, совместное воздействие которых может быть оценено как феномен «взаимного отягощения», исследовались моделирование неалкогольной жировой болезни печени (стеатоза печени, процесс А) и хроническая периодическая волнообразная нормобарическая гипоксия, характерная, например, для сонного апноэ (процесс В). Эти два процесса являются частыми для клинической практики и независимыми по механизму своего формирования. Поэтому гипотетически при одновременном воздействии этих двух патологических процессов может выявляться феномен взаимного отягощения. Для проверки этой гипотезы выполнен двухфакторный эксперимент.

Для моделирования стеатоза печени была использована гиперкалорийная высокожировая диета при избытке легкоусвояемых углеводов, которая создавалась путём добавления к стандартному корму (63%) топленого свиного жира (19%), сахарозы (10%) и изолированного соевого белка (8%) [31]. Такая диета оказывает влияние на жировой и углеводный обмен животных, способствуя развитию у них стеатоза печени и формированию дисгликемии. В качестве объекта исследования были взяты мыши линии C57BL/6/J, общая длительность воздействия — 24 недели.

Для моделирования эффектов гипоксии при сонном апноэ (патологический процесс В) была разработана новая экспериментальная модель длительного прерывистого гипоксического воздействия на лабораторных животных. Ее особенностью был отказ от моделирования частного патологического процесса, неизбежно сказывающегося на функциональном состоянии органов

и систем животных. Системную гипоксию организма при этом создавали методом хронического прерывистого (интермиттирующего) нормобарического гипоксического воздействия, являющегося максимально «чистым» с точки зрения возможных дополнительных патогенетических воздействий. Нормобарическая гипоксия создавалась с использованием мембранного гипоксикатора «БИО-НОВА-2004» («БИО-НОВА», Россия), адаптированного для работы с грызунами. Установка обеспечивает плавную регулировку концентрации кислорода 2–10% в гипоксической газовой смеси (ГГС). Производительность ГГС — не менее 5 л/мин. Процентное содержание кислорода в ГГС, подаваемой животным, регулируется и устанавливается с помощью газоанализатора, который встроено в установку.

В ходе предварительно проведенных исследований было установлено, что гибель лабораторных животных наблюдается при содержании кислорода в ГГС от 5,5% у неустойчивых к гипоксии животных до 3,4% для животных с индивидуально повышенным уровнем устойчивости к гипоксии [19]. В связи с этим, как не вызывающий у животных развития критической гипоксии, для длительного гипоксического воздействия был выбран режим работы гипоксикатора с подачей в камеру с животными 14% гипоксической смеси (парциальное давление кислорода во вдыхаемом воздухе 106,4 мм рт. ст., что соответствует гипоксии на высоте 3250 м над уровнем моря). Лабораторных животных помещали в камеру ежедневно на 6 ч в течение 24-х недель. В среднесуточном варианте такой режим будет соответствовать вдыханию гипоксической газовой смеси с содержанием кислорода 19,1%, парциальное давление кислорода 145,7 мм рт. ст., что примерно соответствует высоте 920 м над уровнем моря [15].

Длительное прерывистое гипоксическое воздействие не ориентировано на выявление

ние собственно эффектов гипоксии, т. к. в условиях гипоксии животные находятся только 6 ч/сут. Однако оно может быть использовано для оценки последствий хронического гипоксического воздействия, в т. ч. поведенческих, метаболических, иммунных и иных, связанных с длительным волнообразным воздействием на животных умеренной гипоксии. Можно предположить, что определяющим фактором, инициирующим перестройку метаболизма, будет выступать хронический гипоксический стресс, а реализация процессов перестройки метаболизма будет зависеть от экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора HIF1 α в различных тканях [20].

Лабораторные животные (мыши-самцы линии C57BL6/J) были получены из ФГУП «ПЛЖ “Рапполово”» (Ленинградская обл.). Содержание животных осуществлялось в условиях сертифицированного вивария в соответствии с приказом МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Лабораторные животные после завершения 14-дневного карантина были рандомизированы на 4 группы: интактная (A0B0), группа с моделированием стеатоза печени (A1B0), группа с гипоксическим воздействием (A0B1) и группа с сочетанным воздействием моделирования стеатоза печени и гипоксического воздействия (A1B1). В каждой группе было по 8 животных начальной средней массой тела 18–21 г.

Биологический материал для исследования (кровь, ткани) у животных забирали на следующие сутки после прекращения гипоксического воздействия. По окончании эксперимента у наркотизированных хлоралгидратом животных забирали кровь методом кардиальной пункции в пробирки с активатором свертывания крови. Через 30 мин отстаивания кровь центрифугировали при 1000 об./мин в течение 10-ти мин, отделяли получившуюся сыворотку, затем вторично цент-

рифугировали при 4000 об./мин в течение 15-ти мин. Полученную сыворотку переносили во вторичные пробирки, которые затем загружали в анализатор.

На биохимическом анализаторе Stat Fax 1904+ (США) и «Эрба Лахема» (Чехия) определяли активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и γ -глутамилтранспептидазы (ГГТП), уровни общего холестерина (ОХ), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и триглицеридов (ТГ), концентрацию глюкозы. Кроме того, в сыворотке крови определяли содержание нейтральных и основных карбонильных групп белков, а в эритроцитах — активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ).

Карбонильные группировки белков печени определяли по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием окрашенных гидразонов [4, 28, 29]. Данные методы основаны на спектрофотометрической регистрации соединений при длинах волн 430 и 370 нм.

Определение активности каталазы крови проводили на основании способности перекиси водорода образовывать с солями молибдата стойкие окрашенные комплексы желтого цвета [27]. Активность супероксиддисмутазы определяли по скорости аутоокисления кверцетина в аэробных условиях [11]. В ткани печени определяли содержание суммарных липидов и гликогена; в скелетных мышцах — гликогена [3, 13].

Статистическую обработку результатов проводили методами описательной статистики, корреляционного и дисперсионного анализа с помощью пакета «Анализ данных» процессора электронных таблиц MS Office Excel. Достоверность различий между группами оценивалась по *F*-критерию дисперсионного анализа ANOVA. Двухфакторный дисперсионный анализ проводился в специализированной программе статистического анализа Statistica 10 [17].

Результаты и их обсуждение

У *интактных животных* исследованные метаболические показатели образывали несколько групп взаимокоррелирующих показателей. Первую группу можно условно обозначить как липидный фактор. К нему относятся такие показатели, как липиды печени, холестерин, триглицериды, АЛТ, АСТ, ГГТП и гликоген печени. Вторую группу показателей образуют глюкоза крови, гликоген мышц и ЛПНП. Такой фактор может быть интерпретирован как углеводный фактор. Третью группу образуют показатели содержания карбонильных групп (нейтральных и основных) в составе белков крови. Они тесно коррелируют между собой. Самостоятельными показателями у интактных животных является активность СОД и каталазы.

Результаты исследования метаболических последствий моделирования патологических процессов представлены в табл. 1.

При анализе табл. 1 обращает на себя внимание, что моделирование *жировой болезни печени* у лабораторных животных проявилось в изменении показателей не столько липидного, сколько углеводного обмена, что свидетельствует о завершении к моменту исследования перестройки метаболических процессов в организме лабораторных животных. Так, исследуемые показатели жирового обмена не имели статистически достоверных отличий от группы интактных животных, а значения их показателей в плазме были даже несколько ниже (например, холестерина — 91%, триглицеридов — 73%, ЛПНП — 82%). Выявленный прирост уровня липидов в печени (+10%) также не был статистически достоверным.

Таблица 1. Влияние моделирования патологических процессов на метаболические показатели у лабораторных животных

Table 1. Effect of simulated pathological processes on metabolic indicators in laboratory animals

Показатель	Ед. измерения	Значения в группах, М±m			
		интактные	ЖБП	гипоксия	ЖБП + гипоксия
<i>В плазме крови</i>					
Глюкоза	ммоль/л	8,3±0,80	5,7±0,70*	5,2±0,80*	7,3±0,80
АлАТ	МЕ/л	22,9±2,60	24,3±4,60	25,0±2,6	19,9±2,10
АсАТ	МЕ/л	65,7±7,30	81,1±14,20	78,8±9,4	72,5±10,50
ГГТП	МЕ/л	0,36±0,09	0,25±0,22	0,05±0,03*	0,36±0,12
Холестерин общий	ммоль/л	1,24±0,09	1,12±0,09	1,23±0,12	1,10±0,10
ЛПНП	ммоль/л	0,23±0,03	0,19±0,01	0,22±0,04	0,20±0,02
Триглицериды	ммоль/л	0,39±0,05	0,28±0,05	0,40±0,03	0,35±0,05
Нейтральные карбонильные группы	Д370 / мг белка	2,18±0,17	2,48±0,12	2,26±0,28	3,04±0,08*
Основные карбонильные группы	Д430 / мг белка	0,62±0,06	1,43±0,07*	0,88±0,15*	1,45±0,04*
<i>В эритроцитах</i>					
СОД	усп. ед. / мл цельной крови	34,2±1,7	36,25±0,77	0,05±0,01*	Следы*
Каталаза	Ммоль H ₂ O ₂ × 10 ³ / мин × мл цельной крови	22,5±0,5	30,6±0,6*	5,7±0,3*	7,0±0,4*
<i>В тканях</i>					
Липиды печени	мг/г ткани	0,06±0,01	0,07±0,01	0,05±0,01*	0,064±0,002
Гликоген печени	мг/г ткани	0,90±0,06	0,53±0,05*	0,19±0,02*	0,57±0,03*
Гликоген скелетных мышц	мг/г ткани	0,40±0,02	0,27±0,02*	0,09±0,01*	0,09±0,01*

Примечание: * — отличия от значений в группе интактных животных достоверны, $p < 0,05$.

Note: * — differences from the values in the group of intact animals are significant, $p < 0,05$.

В то же время содержание гликогена в печени и мышцах лабораторных животных достоверно снижалось на 41 и 33% соответственно, уровень глюкозы в крови снижался на 32%. Обращает на себя внимание также накопление в крови животных основных карбонильных групп (в 2,3 раза), что является маркером активного протекания процессов перекисного и свободнорадикального окисления. Об активации процессов ПОЛ также свидетельствует субстратная активация каталазы (+36%). Перестройка структуры корреляционных связей между показателями метаболизма лабораторных животных при моделировании стеатоза печени представлена в работе [16].

Наиболее выраженные изменения в биохимических показателях после длительного воздействия *умеренного кислородного голодания* отмечаются в клеточных структурах (клетки печени, скелетных мышц, эритроциты), в то время как показатели, регистрируемые в плазме крови животных, вероятно, в силу гомеостатических механизмов, намного более устойчивы к прерывистому гипоксическому воздействию. Это является закономерным, т. к. именно протекающие в клетках энергетические процессы являются объектом действия гипоксии, и последствия хронического волнообразного (интермиттирующего) гипоксического воздействия также должны иметь преимущественно внутриклеточную локализацию.

Так, возникающий при хронической кислородной недостаточности энергодефицит в первую очередь проявляется в мобилизации углеводных резервов организма, что характеризуется снижением гликогена в печени и скелетных мышц в 4–5 раз. Однако даже такой мощной активации гликолитических реакций в тканях оказывается недостаточно для компенсации энергодефицита, что вызывает дополнительную утилизацию глюкозы крови (снижение на 37%) и вовлечение липидов в качестве субстратов энергопродукции (снижение содержания липи-

дов в печени на 27%), переключение потока аминокислот с нефосфорилирующих процессов детоксикации на др. виды обмена (снижение активности субстратзависимого фермента детоксикации ГГТП на 14%).

Возникающий в условиях хронической гипоксии дефицит кислорода закономерно сопровождается угнетением антиоксидантной системы (снижение активности СОД практически в 1000 раз и каталазы в 4 раза) и накоплением недоокисленных продуктов (повышение содержания основных карбонильных группировок в белках крови на 41%).

Данные табл. 1 показывают, что по основным метаболическим показателям плазмы крови животные, подвергнутые комплексному воздействию моделирования жировой болезни печени и длительному прерывистому гипоксическому воздействию, не отличаются от интактных животных. Статистически достоверные отличия проявляются в отношении показателей содержания карбонильных групп белков крови (резкое нарастание основных групп, нарастание нейтральных групп), активности ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах СОД и каталазы (резкое угнетение), а также количества гликогена в печени и в скелетных мышцах (снижение).

С учетом того, что экспериментальное исследование было проведено по схеме двухфакторного анализа, выполнена оценка значимости двух контролируемых факторов: моделирования жировой болезни печени и длительного воздействия прерывистой гипоксии и их взаимодействия (табл. 2). Анализируемый критерий модели — коэффициент детерминации D — показывает, какая часть общей вариативности показателя может быть связана с тем или иным контролируемым фактором.

Таким образом, фактор моделирования жировой болезни существенно влияет на показатели липидов печени, нейтральных и основных карбонильных групп

Таблица 2. Влияние факторов моделирования жировой болезни печени (фактор А) и длительного воздействия прерывистой гипоксии (фактор В) и их взаимодействия (А*В)

Table 2. Effects of simulated liver fat hepatosis (factor A) and prolonged intermittent (factor B) hypoxia, as well as their interaction (A*B)

Показатель	Фактор А		Фактор В		Взаимодействие А*В		Суммарно контролируемые факторы, D	Неконтролируемые факторы, D
	D	p	D	p	D	p		
Липиды печени	0,17	0,008	0,41	0,001	0,03	0,20	0,61	0,39
Гликоген печени	0,001	0,28	0,40	2×10^{-6}	0,41	2×10^{-6}	0,81	0,19
Гликоген мышц	0,06	0,002	0,78	8×10^{-11}	0,05	0,007	0,90	0,10
НейтрКГ	0,17	0,03	0,08	0,14	0,10	0,09	0,35	0,65
ОснКГ	0,66	2×10^{-6}	0,03	0,21	0,008	0,48	0,69	0,31
Каталаза	0,05	3×10^{-8}	0,91	10^{-19}	0,03	6×10^{-6}	0,99	0,01
Глюкоза	0,02	0,47	0,04	0,28	0,25	0,015	0,31	0,69
АлАТ	0,008	0,68	0,001	0,96	0,009	0,68	0,02	0,98
АсАТ	0,02	0,47	0,01	0,60	0,02	0,57	0,05	0,95
ГГТП	0,06	0,23	0,006	0,71	0,08	0,20	0,15	0,85
ОХ	0,06	0,27	0,001	0,96	0,008	0,69	0,07	0,93
ТГ	0,05	0,30	0,09	0,15	0,009	0,65	0,15	0,85
ЛПНП	0,02	0,36	0,06	0,28	0,005	0,23	0,08	0,92

Таблица 3. Оценка аддитивности взаимодействия исследуемых патологических процессов

Table 3. Assessment of the additive interaction of the pathological processes under study

Показатель, ед. измерения	Влияние фактора			Сумма эф-фактов А+В	ИА, оценка взаимодействия
	А	В	А*В		
Гликоген печени, мг/г ткани	-0,37	-0,71	-0,33	-1,08	0,30, частичный антагонизм, игнорирование фактора В
Гликоген мышц, мг/г ткани	-0,13	-0,31	-0,31	-0,44	0,70, частичный антагонизм, игнорирование фактора А
Нейтр. КГ, Д37/мг белка	+0,30	+0,06	+0,86	+0,36	2,39, потенцирование
Осн КГ, Д430/мг белка	+0,81	+0,26	+0,83	+1,07	0,78, частичный антагонизм, игнорирование фактора В
Каталаза, Ммоль $H_2O_2 \times 10^3$ /мин*мл	+8,1	-16,8	-15,5	-8,7	Игнорирование фактора А
Глюкоза, ммоль/л	-2,6	-3,1	-1,0	-5,7	0,17, антагонизм
СОД, усл. ед./мл	+2,05	-33,7	-34,2	-31,65	Игнорирование фактора А
ГГТП, МЕ/л	-0,11	-0,31	0	-0,42	0,00, антагонизм

Примечание: в анализ были включены только те показатели, по которым в табл. 1 и 2 были выявлены достоверные влияния.

Note: the analysis included only those indicators, which demonstrated significant effects according to table 1 and 2.

белков крови. Фактор длительной прерывистой гипоксии существенно влияет на показатели липидов печени, гликогена печени и мышц, каталазы. Взаимодействие этих факторов существенно влияет на показатели гликогена печени и мышц, глюкозы крови, а также активность ферментов антиоксидантной защиты (СОД и каталазы) в эритроцитах. Обращает на себя внимание, что в вариативности показателей сыворот-

ки крови (глюкоза, ферменты, показатели жирового обмена) в основном проявляется действие неконтролируемых факторов.

Результаты оценки аддитивности выявленных показателей взаимодействия двух независимых патологических процессов при одновременном их моделировании на одних и тех же животных представлены в табл. 3.

Проведенные исследования подтверждают, что связанные с моделированием

жировой болезни печени изменения в энергетическом обмене клеток являются независимым фактором, могущим модифицировать (как усиливать, так и ослаблять) для отдельных показателей вызванное длительным прерывистым воздействием гипоксии состояние энергодефицита клеток. Наиболее отчетливое усиливающее (потенцирующее) действие проявляется для показателей уровня нейтральных карбонильных групп белков плазмы, а также в извращенной реакции показателей уровня основных карбонильных групп (игнорирование фактора гипоксии) и активности ферментов антиоксидантной защиты каталазы и СОД (игнорирование действия моделирования стеатоза печени), что свидетельствует о взаимном потенцировании исследуемыми патологическими состояниями процессов перекисного и свободнорадикального окисления липидов. В то же время избыточное поступление высококалорийных субстратов энергетического обмена при моделировании жировой болезни печени в условиях сформировавшегося нового шаблона активности реакций энергетического обмена будет способствовать сохранению углеводных ресурсов организма при гипоксическом энергодефиците. Данный эффект проявляется в меньшем снижении глюкозы

крови и запасов гликогена в печени после длительного гипоксического воздействия (полный или частичный антагонизм взаимодействия).

Заключение

Проведенное исследование показало, что в условиях одновременного воздействия на организм лабораторных животных высококалорийного липидно-углеводного питания (моделирование неалкогольной жировой болезни печени) и длительной прерывистой (интермиттирующей) умеренной нормобарической гипоксии (моделирование сонного апноэ) перестройка процессов метаболизма в основном осуществляется по типу независимых контролируемых факторов. Взаимоотягивающее взаимодействие (коморбидность) для этих моделируемых патологических процессов было выявлено только в отношении процессов перекисного окисления липидов и свободнорадикального окисления.

Тем самым в работе была подтверждена реализуемость предложенной методологии оценки взаимодействия двух одновременно протекающих патологических процессов у лабораторных животных в двухфакторном эксперименте их моделирования с оценкой аддитивности их взаимодействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Белялов Ф.И. *Лечение болезней в условиях коморбидности*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 544 с. [Beljalov F.I. *Lechenie boleznej v uslovijah komorbidnosti [Diseases treatment in the comorbidity conditions]*. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 544 p. (In Russian)].
2. Вёрткин А.Л., Скотников А.С. Роль хронического аллергического воспаления в патогенезе бронхиальной астмы и его рациональная фармакотерапия у пациентов с полипатией. *Лечащий врач*. 2009;4:61–67. [Vjortkin A.L., Skotnikov A.S. Rol' hronicheskogo allergicheskogo vospaleniya v patogeneze bronhial'noj astmy i ego ratsional'naja farmakoterapija u patsientov s polipatiej [Role of chronic allergic inflammation in a pathogeny of bronchial asthma and its rational pharmacotherapy at patients with a polyptahia]. *Lechashhij vrach [Attending doctor]*. 2009;4:61–67. (In Russian)].
3. Давченко Е.О., Чиркин А.А. Новые методические подходы к определению концентрации гликогена в тканях и некоторые комментарии по интерпретации результатов. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2010;3:25–28. [Davchenko E.O., Chirkin A.A. Novye metodicheskie podhody k opredeleniju kontsentratsii glikogena v tkanjah i nekotorye kommentarii po interpretatsii rezul'tatov [New methodical approaches to definition of concentration of a glycogen in fabrics and some comments on interpretation of results]. *Sudebno-medicinskaja jekspertiza [Forensic-medical examination]*. 2010;3:25–28. (In Russian)].
4. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порогов Г.Е. Окислительная модификация белков

- сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопр. мед. химии*. 1995;41(1):24–26. [Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Hodov D.A., Porotov G.E. Okislitel'naja modifikatsija belkov syvorotki krovi cheloveka, metod ee opredelenija [Oxidizing modification of proteins of human blood serum, method of its definition] *Vopr. med. himii [Questions of medical chemistry]*. 1995;41(1):24–26. (In Russian)].
5. Каркищенко В.Н., Клесов Р.А., Степанова О.И., Баранова О.В. Новые биомодели метаболического синдрома. *Биомедицина*. 2018;4:18–28. [Karkischenko V.N., Klesov R.A., Stepanova O.I., Baranova O.V. Novye biomodeli metabolicheskogo sindroma [New biomodels of a metabolic syndrome]. *Biomedicine*. 2018;4:18–28. (In Russian)].
 6. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., и др. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека. *Биомедицина*. 2016;1:52–65. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Bolotskikh L.A., Semenov Kh.Kh., Kapanadze G.D., Petrova N.V., et al. Fiziologo-embriologicheskie aspekty sozdaniya transgennyh myshey s integrirovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka [Physiological and embryological aspects of creating transgenic mice with integrated human NAT1 and NAT2 genes]. *Biomedicine*. 2016;1:52–65. (In Russian)].
 7. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., и др. Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2) человека. *Биомедицина*. 2016;1:4–17. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Karkischenko N.N., Dulya M.S., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., et al. 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;1:4–17. (In Russian)].
 8. 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 (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological studies (successes, failures and prospects)]. *Biomedicine*. 2014;3:4–22. (In Russian)].
 9. Клесов Р.А., Каркищенко В.Н., Степанова О.И., Ревякин А.О. Оптимизация биомодели сахарного диабета I типа. *Биомедицина*. 2014;4:25–30. [Klesov R.A., Karkischenko V.N., Stepanova O.I., Revyakin A.O. Optimizatsiya biomodeli sakharnogo diabeta I tipa [Optimization of biomodel type 1 diabetes]. *Biomedicine*. 2014;4:25–30. (In Russian)].
 10. Коморбидная патология в клинической практике. Клинический реком. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2017;16(6):5–56. [Komorbidnaja patologija v klinicheskoy praktike. Klin. rekom. [Comorbid pathology in clinical practice. Clinical recommendations]. *Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika [Cardiovascular Therapy and Prevention]*. 2017;16(6):5–56. (In Russian)].
 11. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопр. мед. химии*. 1990;36(2):88–91. [Kostjuk V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Zh.V. Prostoj i chuvstvitel'nyj metod opredelenija aktivnosti superoksidismutazy, osnovannyj na reakcii okislenija kvertsetina [The simple and sensitive method of determination of activity superoxide dismutases based on quercetin oxidation reaction]. *Vopr. med. himii [Questions of medical chemistry]*. 1990;36(2):88–91. (In Russian)].
 12. Лещенко Д.В., Костюк Н.В., Белякова М.Б., Егорова Е.Н., Миняев М.В. Лептиндефицитные и лептинрезистентные линии грызунов как модели метаболического синдрома. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;4:9. [Leshhenko D.V., Kostyuk N.V., Belyakova M.B., Egorova E.N., Minyaev M.V. Leptindefitsitnye i leptinrezistentnye linii gryzunov kak modeli metabolicheskogo sindroma [Leptin deficiency and leptin resistance lines of rodents as models of a metabolic syndrome]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya [Modern problems of science and education]*. 2015;4:9. (In Russian)].
 13. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)* / Под ред. М. Прохоровой. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. 272 с. [Metody biohichimicheskikh issledovaniy (lipidnyj i jenergeticheskij obmen) [Methods of biochemical researches (lipidic and power exchange)]. Ed. by M. Prokhorova. Leningrad: LGU Publ., 1982. 272 p. (In Russian)].
 14. Наумова Л.А., Осипова О.Н. Коморбидность: механизмы патогенеза, клиническое значение. *Современные проблемы науки и образования*. 2016;5. [Naumova L.A., Osipova O.N. Komorbidnost': mehanizmy patogeneza, klinicheskoe znachenie [Comorbidity: pathogenesis mechanisms, clinical value]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya [Modern problems of science and education]*. 2016;5. (In Russian)].
 15. Новиков В.С., Сороко С.И., Шустов Е.Б. *Дезадаптационные состояния человека при экстремальных воздействиях и их коррекция*. СПб.: Политехника-принт, 2018. 548 с. [Novikov V.S., Soroko S.I., Shustov E.B. *Dezadaptatsionnye sostojaniya cheloveka pri jekstremal'nyh vozdeystvijah i ih korrektsija [Disadaptation conditions of the person at extreme*

- influences and their correction*]. Saint Petersburg: Politekhnik-print Publ., 2018. 548 p. (In Russian)].
16. Оковитый С.В., Шустов Е.Б., Белых Н.В., Кириллова Н.В., Спасенкова О.М., Иванов А.Г., и др. Моделирование неалкогольного стеатоза печени: особенности метаболических изменений в организме лабораторных животных. *Биомедицина*. 2018;4:29–43. [Okovityj S.V., Shustov E.B., Belyh N.V., Kirillova N.V., Spasenkova O.M., Ivanov A.G., et al. Modelirovanie nealkogol'nogo steatoza pecheni: osobennosti metabolicheskikh izmenenij v organizme laboratornyh zhivotnyh [Modeling of not alcoholic liver steatosis: features of metabolic changes in an organism of laboratory animals]. *Biomedicine*. 2018;4:29–43. (In Russian)].
 17. Реброва О.Ю. *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica*. М.: МедиаСфера, 2002. 70 с. [Rebrova O.Yu. *Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm Statistica [Statistical analysis of medical data. Application of an application program package Statistica]*. Moscow: MediaSfera, 2002. 70 p. (In Russian)].
 18. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль-К, 2010. 358 с. [*Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modeljam v biomeditsinskih issledovanijah [The guide to laboratory animals and alternative models in biomedical researches]*. Ed. by N.N. Karkischenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil'-K, 2010. 358 p. (In Russian)].
 19. Титович И.А., Болотова В.Ц. Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокетанола. *Биомедицина*. 2016;2:77–83. [Titovich I.A., Bolotova V.Ts. Eksperimental'noe izuchenie antigipoksicheskoj aktivnosti novogo proizvodnogo aminoetanol'a [Experimental studying of antihypoxic activity of new derivative aminoethanol]. *Biomedicine*. 2016;2:77–83. (In Russian)].
 20. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Семенов Х.Х., Оковитый С.В., Радько С.В. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1 α как критерий развития гипоксии тканей. *Биомедицина*. 2015;4:4–15. [Shustov E.B., Karkischenko N.N., Dulja M.S., Semenov Kh.Kh., Okovityj S.V., Rad'ko S.V. Ekspressija gipoksija-inducibel'nogo faktora HIF-1 α kak kriterij razvitiya gipoksii tkanej [The expression of hypoxia-inducible factor HIF-1 α as a criterion for the development of tissue hypoxia]. *Biomedicine*. 2015;4:4–15. (In Russian)].
 21. Aronow W.S., Ahn C., Mercado A.D., Epstein S. Prevalence of coronary artery disease, complex ventricular arrhythmias, and silent myocardial ischemia and incidence of new coronary events in older persons with chronic renal insufficiency and with normal renal function. *Am. J. Card.*, 2000;86(10):1142–1143.
 22. Bruce S.G., Riediger N.D., Zacharias J.M., Young T.K. Obesity and obesity-related comorbidities in a Canadian First Nation population. *Prev. Chronic Dis*. 2011;8(1):A03.
 23. Caughey G.E., Ramsay E.N., Vitry A.I., Gilbert A.L., Luszcz M.A., Ryan P., et al. Comorbid chronic diseases, discordant impact on mortality in older people: a 14-year longitudinal population study. *J. Epidemiol. Community Health*. 2010;64(12):1036–1042.
 24. de Groot V., Beckerman H., Lankhorst G.J., Bouter L.M. How to measure comorbidity: a critical review of available methods. *J. Clin. Epidemiol*. 2003;56(3):221–229.
 25. Feinstein A.R. Pre-therapeutic classification of comorbidity in chronic disease. *J. Chronic Disease*. 1970;23(7):455–468.
 26. Gijzen R., Hoeymans N., Schellevis F.G., Ruwaard D., Satariano W.A. Causes and consequences of comorbidity: a review. *J. Clin. Epidemiol*. 2001;54(7):661–674.
 27. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*. 1991;196(2–3):143–152.
 28. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464–478.
 29. Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991;88(23):10540–105403.
 30. Taylor V.M., Anderson G.M., McNeney B., Diehr P., Lavis J.N., Deyo R.A., et al. Hospitalizations for back and neck problems: a comparison between the Province of Ontario and Washington State. *Health Serv. Res*. 1998;33(4):929–945.
 31. Xu B.L., Wang R., Ma L.N. Effects of caloric intake on learning and memory function in juvenile C57BL/6J mice. *Biomed. Res. Int*. 2015:759–803.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Оковитый Сергей Владимирович, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: okovityy@pharminnotech.com

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

Шустов Евгений Борисович*, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России; ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»;
e-mail: shustov-msk@mail.ru

Белых Мария Александровна, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: belych.mariya@pharminnotech.com

Кириллова Надежда Васильевна, д.б.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: nadezhda.kirillova@pharminnotech.com

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

Иванов Алексей Геннадьевич, к.х.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: alexey.ivanov@pharminnotech.com

Караваяева Анна Владимировна, к.б.н., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: anna.karavaeva@pharminnotech.com

Sergey V. Okovityy, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: okovityy@pharminnotech.com

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

Evgeniy B. Shustov*, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: shustov-msk@mail.ru

Mariya A. Belykh, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: belych.mariya@pharminnotech.com

Nadezhda V. Kirillova, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: nadezhda.kirillova@pharminnotech.com

Ol'ga M. Spasenkova, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: olga.spasenkova@pharminnotech.com

Aleksey G. Ivanov, Cand. Sci. (Chem.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: alexey.ivanov@pharminnotech.com

Anna V. Karavaeva, Cand. Sci. (Biol.), Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: anna.karavaeva@pharminnotech.com

Ивкин Дмитрий Юрьевич, к.б.н., доц.,
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

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

Матвеенко Елена Леонидовна, к.э.н., доц.,
ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства
России»;
e-mail: matveyenkoel@mail.ru

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

Dmitriy Yu. Ivkin, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.,
Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical
University of the Ministry of Health of the Russian
Federation;
e-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

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

Elena L. Matveyenko, Cand. Sci. (Econ.), Assoc.
Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency of
Russia;
e-mail: matveyenkoel@mail.ru

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

КРИОСОХРАНЕНИЕ СРЕЗОВ МОЗГА КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТЬЮ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ИХ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

А.А. Мокрушин

ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН
199034, Российская Федерация, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Исследовали влияние криосохранения переживающих срезов мозга крыс-самцов популяции линий Wistar с различной длительностью (4, 8, 10, 23 и 90 сут) на изменения электрической активности. Измерялись амплитуды АМПА- и НМДА-зависимых глутаматергических ионотропных механизмов, а также потенциала действия латерального обонятельного тракта (ПД ЛОТ) при температуре -20°C и последующем отогревании до $+37^{\circ}\text{C}$. После криоконсервации эти механизмы сохранялись и восстанавливались. Использовалась методика электрофизиологической регистрации АМПА-, НМДА-потенциалов и суммарного ПД ЛОТ. После криосохранения АМПА-зависимые механизмы и активность проводящих волокон ЛОТ восстанавливались до нормотермических значений. Напротив, восстановление НМДА-зависимых механизмов было неполным и составляло в среднем 34% по сравнению с нормотермическими значениями. Результаты свидетельствуют, что после криоконсервации срезов мозга крыс активности базовых ионотропных глутаматергических механизмов восстанавливаются.

Ключевые слова: срезы мозга крыс, криоконсервация, АМПА-зависимые механизмы, НМДА-зависимые механизмы

Конфликт интересов: автор заявил об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 65.2).

Для цитирования: Мокрушин А.А. Криосохранение срезов мозга крыс с различной длительностью и восстановление их электрической активности. *Биомедицина*. 2019;15(4):98–106. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-98-106>

Поступила 13.02.2019

Принята после доработки 18.09.2019

Опубликована 10.12.2019

CRYOPRESERVATION OF RAT BRAIN SLICES WITH DIFFERENT DURATION AND RESTORATION OF THEIR ELECTRICAL ACTIVITY

Anatoliy A. Mokrushin

Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences
199034, Russian Federation, Saint Petersburg, Makarova embankment, 6

Effects of cryopreservation of male Wistar rat brain slices with different duration (4, 8, 10, 23, and 90 days) on changes in their electrical activity was investigated. The amplitudes of AMPA- and NMDA-dependent glutamatergic ionotropic mechanisms were measured, as well as the action potential of the lateral olfactory tract (AP LOT) at a temperature of -20°C and subsequent warming to $+37^{\circ}\text{C}$. After cryopreservation, these mechanisms were preserved and restored. We used the method of electrophysiological registration

of the AMPA and NMDA potentials and the total AP LOT. After cryopreservation, the AMPA-dependent mechanisms and the activity of conductive LOT fibers were restored to normothermal values. On the contrary, the recovery of NMDA-dependent mechanisms was incomplete and averaged 34% compared with the normothermal values. The results indicate that, after cryopreservation, the activity of basic ionotropic glutamatergic mechanisms in rat brain slices is restored.

Keywords: rat brain slices, cryopreservation, AMPA-dependent mechanisms, NMDA-dependent mechanisms

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

Funding: The study was financially supported by the Programme of Basic Research in RF Academies for 2013–2020 (GP-14, Section 65.2).

For citation: Mokrushin A.A. Cryopreservation of Rat Brain Slices with Different Duration and Restoration of Their Electrical Activity. *Journal Biomed.* 2019;15(4):98–106. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-98-106>

Submitted 13.02.2019

Revised 18.09.2019

Published 10.12.2019

Введение

Криосохранение — это перспективная биотехнология, позволяющая длительно сохранять биологический материал в жизнеспособном состоянии при низких температурах. Исследование обратимого ингибирования активности клеток и органов млекопитающих после их криоконсервации имеет практическое значение с развитием методов трансплантации тканей, органов и необходимостью создания криобанка трансплантатов.

В настоящее время в медицине и ветеринарии успешно применяется низкотемпературное хранение однопипных клеток (ооциты, сперматозоиды, клетки крови и др.) с последующим восстановлением их биологических функций после отогревания. Что касается сложноорганизованных органов и тканей, например нервной, то методы криоконсервации до сих пор детально не разработаны для использования в клинических условиях. Очевидно, это связано с гетерогенным клеточным составом нервной ткани (разного типа нейроны, глиальные клетки, синапсы) и отсутствием стандартных протоколов процесса замораживания/отогревания [12].

При разработке протоколов криоконсервации нервной ткани переживающие срезы мозга являются оптимальными экспе-

риментальными объектами для изучения закономерностей криосохранения нервной системы. Они представляют собой эксплантат мозга размером 10×15 мм и толщиной 400–500 мкм. В срезах мозга можно регистрировать электрическую активность нейронов и синапсов аналогично условиям *in vivo* для моделирования нормальных и патологических состояний мозга [6].

Исследования криосохранения на срезах мозга выявили закономерности воздействия скорости и глубины замораживания на восстановление синаптической активности в срезах мозга, а также применения некоторых криопротекторов [10]. В данном исследовании для разработки биотехнологий криосохранения нервной ткани использовали глубину замораживания -20°C . Обнаружено, что активность энзимов в клетках при такой температуре ингибируется, но восстанавливается при отогревании [5].

Целью исследования явилось определение влияния криосохранения срезов мозга при температуре -20°C с различной длительностью (недели, месяцы) на восстановление электрической активности в виде ионотропных глутаматергических рецепторных АМПА- (α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая

кислота) и НМДА-зависимых (*N*-метил-D-аспартат) механизмов. Кроме того, были изучены эффекты криосохранения проводящих нервных волокон латерального обонятельного тракта (ЛОТ), который локализован в срезах обонятельной коры мозга крыс. Скорости замораживания/отогревания срезов мозга не превышали 0,1–0,125°C/мин, и не использовались криопротекторы.

Материалы и методы

В исследованиях использовались белые крысы-самцы популяции линий Wistar массой 180–200 г. Все эксперименты проведены на крысах из биокolleкции «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенных European Communities Council Direction (86/609 ЕЕС). Опыты с животными были одобрены в строгом соответствии с Руководством Совета Федерации по уходу и использованию лабораторных животных (1994 г.) и с руководящими принципами Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (1996 г.).

Тангенциальные срезы толщиной 400–500 мкм изготавливали из мозга крыс-самцов популяции линий Wistar (по 13 контрольных и опытных животных) [2]. Из мозга крыс-самцов были приготовлены по 25 контрольных и опытных срезов, каждый из которых преинкубировали отдельно в стеклянных виалах инкубационной средой объемом 1 мл в аппарате Варбурга (Германия) при температуре +37°C. Обе группы животных (контрольная и опытная) были идентичны по весу, режиму кормления и содержания в виварии.

После преинкубации в течение 2-х ч срезы помещали в камеру электрофизио-

логической установки [3] и перфузировали со скоростью 2 мл/мин искусственной церебральной жидкостью следующего состава (мМ): NaCl — 124,0; KCl — 5,0; CaCl₂ — 2,6; KH₂PO₄ — 1,24; MgSO₄ — 1,2; NaHCO₃ — 3,0; глюкоза — 10,0; трис-HCl — 23,0; pH — 7,2–7,3.

Электрическая активность срезов определялась при регистрации АМПА-, НМДА-потенциалов. Регистрацию этих потенциалов производили экстраклеточно стеклянными микроэлектродами, заполненными 1М NaCl, сопротивлением 1–5 МОм в ответ на одиночные ортодромные электрические импульсы (прямоугольной формы, длительностью 0,1 мс, интенсивностью 1–3 В, частотой 0,003 Гц) ЛОТ. Индифферентный хлорсеребряный электрод располагали в камере.

АМПА-, НМДА-потенциалы усиливались прибором (НТО, Россия) и оцифровывались аналого-цифровым интерфейсом (Е 20-10, Россия) с частотой квантования 25 кГц. С помощью специальной программы на компьютере анализировались изменения амплитуд АМПА-, НМДА-потенциалов.

Химические реактивы, необходимые для приготовления инкубационной среды, получены от фирмы «Химреактив» (Россия).

Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием непараметрического анализа (*U*-критерий Вилкоксона — Манна — Уитни). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Протокол криосохранения заключался в следующем. Срезы после преинкубации помещались в проточную камеру электрофизиологической установки, и в них регистрировались амплитуды АМПА-, НМДА-потенциалов при температуре +37°C [3]. Затем срезы градуально охлаждались до температуры +16°C в установке при медленных скоростях (0,1–0,125°C/мин). Далее срезы переносили в стеклянные виалы с инкубационным

р-ром объемом 1 мл, постепенно замораживали до -20°C и сохраняли в морозильнике термостата ThermoStat plus (Eppendorf, Germany).

После криосохранения срезы отогревались с медленными скоростями ($0,1-0,125^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) до $+37^{\circ}\text{C}$ и затем переносились в перфузионную камеру электрофизиологической установки. В ней изучали степени восстановления электрической активности глутаматергических ионотропных механизмов по изменениям амплитуд АМПА-, НМДА-потенциалов и ПД ЛОТ после различных временных интервалов их криосохранения: 4, 8, 10, 23 и 90 сут.

Результаты и их обсуждение

Срезы мозга после криоконсервации были испытаны на возникновение и восстановление АМПА- и НМДА-потенциалов и пресинаптического компонента — ПД ЛОТ в течение 15–20 мин. Скорость отогревания срезов составляла $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Было выявлено, что во всех срезах (100%, $n=25$) активности АМПА- и НМДА-механизмов восстанавливались после криоконсервации с различной длительностью.

Далее анализировались степени восстановления активностей АМПА-, НМДА-зависимых механизмов после различных сроков криосохранения.

Степени сохранения активностей АМПА- и НМДА-механизмов были различны (рис. 1). Так, активность проводящих волокон ЛОТ (амплитуда ПД ЛОТ) восстанавливалась после 10-ти сут, но возрастала после 23-х и 90-та сут криосохранения. Активность АМПА-механизмов возрастала при меньших сроках криосохранения (рис. 1А, Б), но после 90-та сут она восстанавливалась до контрольного значения (рис. 1В). Степень восстановления активности НМДА-механизмов после всех сроков криосохранения была меньше по сравнению с ПД ЛОТ и АМПА-механизмов (рис. 1).

Для выяснения, как воздействуют различные сроки криосохранения на восстановленные активности проводящих волокон (ПД ЛОТ), АМПА- и НМДА-механизмов, были проанализированы суммарные данные изменения амплитуд этих потенциалов.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что амплитуды АМПА-потенциалов после отогревания увеличивались в течение всего времени отогревания и статистически не отличались от контрольных значений после 4-х и 23-х сут криосохранения ($U=15$, $n=25$, $p\geq 0,05$) (рис. 2). В интервалах 8-ми и 10-ти сут криосохранения амплитуды АМПА-потенциалов достоверно превышали контрольные значения в среднем на 47% ($U=7$, $n=25$, $p\leq 0,05$). Эти данные показывают, что воздействие кратковременной криоконсервации способствует восстановлению активностей АМПА-зависимых рецепторных механизмов.

Криосохранение НМДА-механизмов представляет особый интерес, поскольку известно, что при обучении активности НМДА-рецепторов являются исключительно важными для инициирования функциональной пластичности, связанной с обучением [13].

Результаты исследований выявили, что НМДА-зависимые механизмы после криосохранения, в отличие от изменений активности АМПА-зависимых механизмов, восстанавливались иным образом. Амплитуды НМДА-потенциалов имели тенденцию к восстановлению, но значение их амплитуд составляло в среднем 11% по сравнению с амплитудой до замораживания после 4-х, 8-ми, 10-ти и 90-та сут криоконсервации (рис. 3). Было выявлено, что восстановление амплитуд НМДА-потенциалов усиливалось после 23-х сут криоконсервации и составляло в среднем $53\pm 12\%$ ($U=8$, $n=25$, $p\leq 0,05$) (рис. 3).

Данные, представленные выше, свидетельствуют о том, что НМДА-зависимые

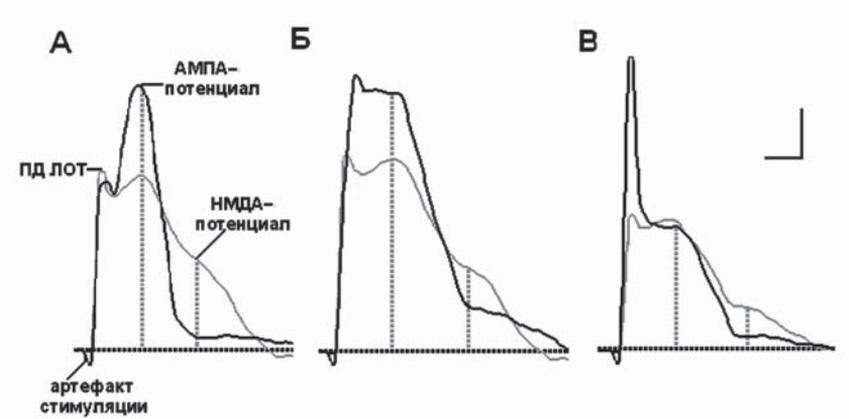


Рис. 1. Изменения амплитуд ПД ЛОТ, АМПА- и НМДА-потенциалов после криосохранения с различными длительностями: 10 (А), 23 (Б) и 90 (В) сут при отогревании срезов до +37°C.

Примечание: Горизонтальная пунктирная линия — изолиния. Вертикальные серые линии показывают амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов. Потенциал ПД ЛОТ показан стрелкой. Измерения амплитуд потенциалов производились от изолинии до пика. Калибровка: 0,1 мВ; 5,0 мс.

Fig. 1. Changes in the amplitudes of AP LOT, AMPA and NMDA potentials after cryopreservation with different duration: 10 (A), 23 (B), and 90 (B) days when the slices were rewarming to +37°C.

Note: Horizontal dashed line — isoline. Vertical gray lines show the amplitudes of the AMPA and NMDA potentials. The potential of AP LOT is shown by an arrow. The amplitudes of the potentials were measured from the isoline to the peak. Calibration: 0.1 mV; 5.0 ms.

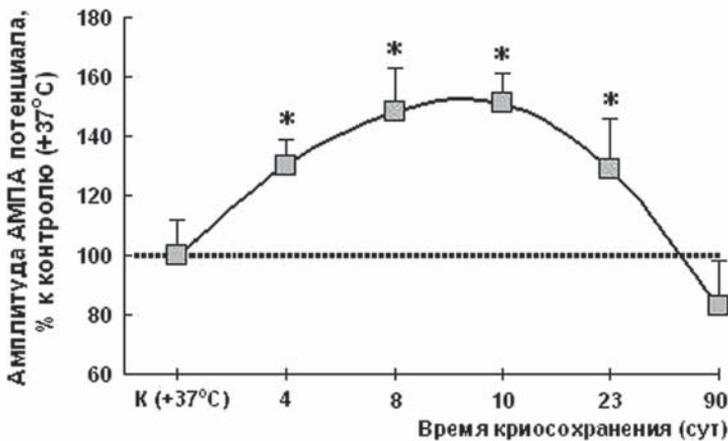


Рис. 2. Изменения амплитуды АМПА-потенциалов после криосохранения с различными длительностями при отогревании срезов до +37°C.

Примечание: По оси абсцисс: К (+37°C) — контрольные значения АМПА-потенциалов при +37°C. Горизонтальная пунктирная линия — контрольные значения АМПА-потенциалов при +37°C до замораживания. n=25 для каждой точки, * — $p \leq 0,05$; U-критерий Вилкоксона — Манна — Уитни.

Fig. 2. Changes in the amplitude of the AMPA potentials after cryopreservation with different duration when re-warming slices to +37°C.

Note: On the abscissa axis: K (+37°C) — control values of AMPA potentials at +37°C. The horizontal dashed line is the control values of the AMPA potentials at +37°C before freezing. n=25 for each point, * — $p \leq 0.05$; Wilcoxon — Mann — Whitney U-test.

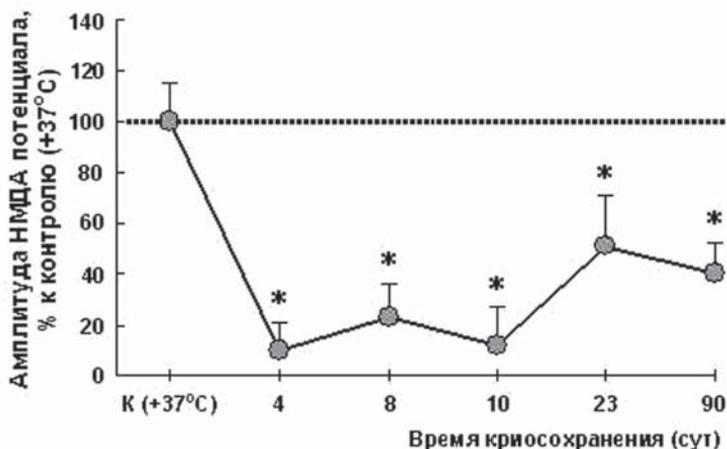


Рис. 3. Изменения амплитуды НМДА-потенциалов после криосохранения с различными длительностями при отогревании срезов до +37°C.

Примечание: Обозначения как на рис. 2.

Fig. 3. Changes in the NMDA potential amplitude after cryopreservation with different duration during re-warming slices to +37°C.

Note: Designations as in Fig. 2.

механизмы наиболее уязвимы к действию глубокого замораживания -20°C и последующего отогревания до нормотермических значений.

В работе было проанализировано восстановление суммарной активности волокон ЛОТ после различных сроков криосохранения. Было обнаружено, что амплитуды ПД ЛОТ после криоконсервации восстанавливались (рис. 4). Рассматривая влияние длительности криосохранения на степени восстановления активности волокон ЛОТ, можно выявить определенную закономерность. Так, после 4-х сут криоконсервации активность волокон ЛОТ восстанавливалась до $76 \pm 10\%$ и достоверно отличалась от контрольных значений ($U=7, n=5, p \leq 0,05$). Пролонгация длительности криосохранения до 8-ми, 10-ти сут способствовала полному восстановлению волокон ЛОТ. Дальнейшее увеличение длительности до 23-х и особенно до 90-та сут криосохранения вызывало значительное возрастание амплитуд ПД ЛОТ, достоверно превышающее контрольные значе-

ния до замораживания срезов ($U=11, n=5, p \leq 0,05$) (рис. 4).

Таким образом, увеличение длительности криосохранения сопровождается не только восстановлением активности волокон ЛОТ, но их гиперактивацией после отогревания.

В результате проведенных исследований были получены данные, которые свидетельствуют, что после криоконсервации срезов мозга негипернующих животных (крыс) активность ионотропных глутаматергических АМПА- и НМДА-зависимых механизмов, а также активность проводящих волокон ЛОТ восстанавливались.

Существенными факторами примененного нами протокола криосохранения были глубина и скорость замораживания/отогревания. Для криоконсервации срезов мозга была применена глубина замораживания срезов -20°C . Такой выбор температуры был основан на установленном факте, что метаболическая активность клеток ингибируется, но не блокируется [5]. Важно отметить, что в проведенном исследовании была использована медленная скорость

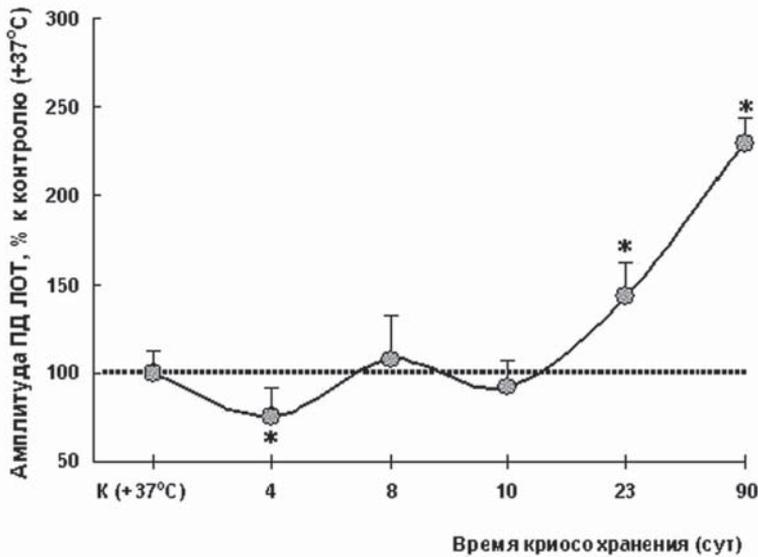


Рис. 4. Изменения амплитуды суммарного ПД ЛОТ после криосохранения с различными длительностями при отогревании срезов до +37°C.

Примечание: Обозначения как на рис. 2.

Fig. 4. Changes in the total AP LOT amplitude after cryopreservation with different duration during re-warming slices to +37°C.

Note: Designations as in Fig. 2.

замораживания/отогревания срезов мозга (не более 0,125°C/мин). Этот прием был основан на результатах наших предыдущих исследований, в которых было показано, что скорости 0,1–0,125°C/мин замораживания/отогревания способствовали восстановлению активности АМПА- и НМДА-зависимых механизмов [9, 10].

Особое внимание в работе было обращено на выявление закономерностей влияния различных длительностей криоконсервации на сохранение и восстановление активности АМПА- и НМДА-зависимых механизмов, а также активностей проводящих волокон ЛОТ.

Анализ результатов экспериментов показал, что глутаматергические синаптические механизмы, а также активности проводящих волокон после всех интервалов длительности криоконсервации в срезах сохранялись и восстанавливались при отогревании, и были определены резистент-

ности этих механизмов к примененному протоколу криосохранения. Обнаружено, что резистентности исследованных механизмов к воздействию замораживания и последующего отогревания оказались различными. При сопоставлении толерантности глутаматергических механизмов к воздействию криосохранения выявилась закономерность, что АМПА-зависимые механизмы, а также активности проводящих волокон были более устойчивы к процедуре криосохранения. Активности этих механизмов восстанавливались при отогревании, а активность волокон ЛОТ была гиперактивирована при длительных сроках криосохранения (23 и 90 сут).

Напротив, резистентность НМДА-зависимых механизмов к воздействию различных длительностей криосохранения была ниже, чем АМПА-зависимых механизмов. Активность этих процессов восстанавливалась до 15–50% по отно-

шению к нормотермическому контролю до криосохранения.

Учитывая эти особенности восстановления НМДА-механизмов после криосохранения, можно полагать, что для оптимизации процесса криоконсервации гетерогенных структур эксплантатов мозга необходимо применять криопротекторы. Вместе с тем необходимо принимать во внимание, что применение традиционных криопротекторов, таких как диметилсульфоксид, этиленгликоль, глицерин и др., вызывает нарушение функционирования синаптических механизмов в мозговых структурах [1, 4, 7].

При поиске криопротекторов, не вызывающих токсические эффекты, следует ориентироваться на вещества эндогенного происхождения, такие как белки теплового шока [8], дипептид карнозин [11], пептид TSKY (Thr-Ser-Lys-Tyr), выделенный из мозга зимоспящих сусликов [1]. Эти вопросы планируется изучить в следующих исследованиях.

Важный аспект наших исследований заключался в том, что были проанализированы влияния различных длительностей криоконсервации на восстановление активностей волокон ЛОТ. Отметим, что для клинки криосохранение нервов представляет важное значение при трансплантации нервных волокон.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что при всех сроках криосохранения происходит полное восстановление активностей волокон ЛОТ. Более того, при больших сроках криокон-

сервации (23, 90 сут) они гиперактивировались. Вероятно, что такая гиперактивация проявляется у немиелинизированных волокон группы В в составе ЛОТ. Отсутствие миелиновой оболочки этих нервных волокон индуцирует нарушение функционирования их мембран и натриевых каналов в них в процессе криоконсервации, тогда как миелиновые оболочки волокон ЛОТ группы А δ защищают мембраны и оптимизируют функции натриевых каналов в них.

Заключение

В результате проведенных исследований впервые получены данные, которые свидетельствуют, что после криоконсервации с глубиной замораживания эксплантатов мозга при температуре -20°C и медленной скорости замораживания/отогревания ($0,125^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) электрические активности глутаматергических ионотропных механизмов (АМПА и НМДА), а также проводящих волокон ЛОТ в срезах мозга негиберирующих животных (крыс) восстанавливаются. В таком протоколе криосохранения не использовались криопротекторы и применялась медленная скорость замораживания/отогревания.

Следует отметить, что воздействию длительной криоконсервации подвергались механизмы глутаматергической медиаторной системы, которая является доминирующей в мозге теплокровных. Полученные данные, как можно полагать, будут способствовать разработке биотехнологии длительной криоконсервации нервной ткани для создания криобанка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ивличева Н.А., Чистопольский И.А., Крамарова Л.И. Электрофизиологическая активность мозга моллюска *lymnaea stagnalis* после криоконсервации в жидком азоте (-196°C). *Биологические мембраны*. 2014;31(5):342–351. [Ivlicheva N.A., Chistopolsky I.A., Kramarova L.I. Elektrofizyologicheskaya aktivnost' mozga mollyuska *lymnaea stagnalis* posle kriokonservatsii v zhidkom azote (-196°C) [Electro-physiological activity of the brain of the mollusk *lymnaea stagnalis* after cryopreservation in liquid nitrogen (-196°C)]. *Biological Membranes*. 2014;31(5):342–351. (In Russian)].
2. Митюшов М.И., Емельянов Н.А., Мокрушин А.А. *Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрохимического исследования*. Л.: Наука, 1986. 127 с. [Mityushov M.I., Emelyanov N.A., Mokrushin A.A. *Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрохимического исследования*. Л.: Наука, 1986. 127 с. [Mityushov M.I., Emelyanov N.A., Mokrushin A.A. *Surviving brain slice as an object of neurophysiological and neurochemical research*. L.: Nauka, 1986. 127 p.]

- nov N.A., Mokrushin A.A. *Perezzhivayushchiy srez mozga kak ob'ekt neyrofiziologicheskogo i neyrokhimicheskogo issledovaniya [The surviving brain slices as an object of neurophysiological and neurochemical research]*. Leningrad: Nauka, 1986. 127 p. (In Russian)].
3. Мокрушин А.А., Боровиков С.Е. Установка для изучения гипотермических эффектов на переживающих срезах мозга теплокровных. *Международный журнал прикладных фундаментальных исследований*. 2017;2(2):214–217. [Mokrushin A.A., Borovikov S.E. Ustanovka dlya izucheniya gipotermicheskikh effektov na perezhivayushchikh srezakh mozga teplokovnykh [Installation for the study of hypothermic effects on surviving brain slices of warm-blooded]. *International Journal of Applied Basic Research*. 2017;2(2):214–217. (In Russian)].
 4. Пичугин Ю.И. *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии*. М.: Медицина, 2013. С. 60–62. [Pichugin Yu.I. *Teoreticheskiye i prakticheskiye aspekty sovremennoy kriobiologii [Theoretical and practical aspects of modern cryobiology]*. Moscow: Medicine, 2013. P. 60–62. (In Russian)].
 5. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*. 2009;5:119–126.
 6. Cho S., Wood A., Bowlby M.R. Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics. *Curr. Neuropharmacol*. 2007;5:19–33.
 7. Fang F., Zhang Z.-X. Cryopreservation of embryonic cerebral tissue of rat. *Cryobiology*. 1992;29:267–273.
 8. Mokrushin A.A., Pavlinova L.I. Hsp70 promotes synaptic transmission in brain slices damaged by contact with blood clot. *Eur. J. Pharmacol*. 2011;674:20–28.
 9. Mokrushin A.A., Pavlinova L.I., Borovikov S.E. Influence of cooling rate on activity of ionotropic glutamate receptors in brain slices at hypothermia. *J. Therm. Biol*. 2014;44:5–13.
 10. Mokrushin A.A. Effects cryopreservation of ionotropic glutamatergic receptor mechanisms *in vitro*. *Cryo-Letters*. 2015;36(6):367–377.
 11. Mokrushin A., Pavlinova L. Neurotropic and Protective Effects of L-carnosine: Studies *in vitro*. In: *Carnosine: Physiological Effects and Research Insights*. Ed. by D. Wells. New York: Nova Science Publishers, 2016. P. 113–158.
 12. Paynter S.J. Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells. *Brain Res. Bull*. 2008;75:1–14.
 13. Rebola N., Srikmuar B.N., Mülle C. Activity-Dependent Synaptic Plasticity of NMDA Receptors. *J. Physiol*. 2010;588:93–99.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ | INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Мокрушин Анатолий Александрович, д.б.н.,
ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН;
e-mail: mok@inbox.ru

Anatoliy A. Mokrushin, Dr. Sci. (Biol.), Pavlov
Institute of Physiology of the Russian Academy of
Sciences;
e-mail: mok@inbox.ru

ИЗМЕНЕНИЕ АМПЛИТУДНЫХ И СПЕКТРАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ЭЛЕКТРОКОРТИКОГРАММ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВУЮ ТРАВМУ

Ю.И. Сысоев^{1,2,*}, К.А. Крошкина¹, В.А. Пьянкова¹, В.Е. Карев³, С.В. Оковитый¹

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

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

² Институт трансляционной биомедицины ФГБОУ ВО

«Санкт-Петербургский государственный университет»

199034, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

³ ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней
Федерального медико-биологического агентства»

197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9

Проведен амплитудный и спектральный анализ кортикографической активности крыс, перенесших травматическое повреждение головного мозга (открытая проникающая черепно-мозговая травма). Запись электрокортикограмм (ЭКоГ) осуществляли на 3-и и 7-е сутки после травмы. Амплитудный анализ включал в себя оценку средней амплитуды сигнала, а спектральный — расчет величины средней амплитуды и индексов δ -, θ -, α - и β -ритмов. Выявлены характерные изменения амплитудных и спектральных характеристик ЭКоГ у крыс, перенесших черепно-мозговую травму (ЧМТ). У испытуемых животных травматическое повреждение двигательной коры и нижележащих структур приводило к уменьшению средней амплитуды сигнала, а также снижению амплитуд и индексов θ -, α - и β -ритмов. Одновременно увеличивалась средняя амплитуда и индекс медленноволнового δ -ритма. Схожие изменения наблюдали как в области повреждения, так и в других участках коры и на 3-и и 7-е сутки после травмы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данная модель черепно-мозговой травмы имеет много электрофизиологических сходств с травмами, наблюдаемыми у пациентов в клинической практике и, следовательно, может быть использована в дальнейших нейрофизиологических и фармакологических исследованиях.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, электрокортикограмма, амплитудный анализ, спектральный анализ

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Сысоев Ю.И., Крошкина К.А., Пьянкова В.А., Карев В.Е., Оковитый С.В. Изменение амплитудных и спектральных параметров электрокортикограмм крыс, перенесших черепно-мозговую травму. *Биомедицина*. 2019;15(4):107–120. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-107-120>

Поступила 16.05.2019

Принята после доработки 25.10.2019

Опубликована 10.12.2019

AMPLITUDE AND SPECTRAL ANALYSIS OF ELECTROCORTICOGRAMS IN RATS WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY

Yuriy I. Sysoev^{1,2,*}, Kseniya A. Kroshkina¹, Valentina A. P'yankova¹, Vadim E. Karev³,
Sergey V. Okovitiy¹

¹ Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health
of the Russian Federation

197376, Russian Federation, Saint Petersburg, Professora Popova str., 14A

² Institute of Translational Biomedicine of the Saint-Petersburg State University
199034, Russian Federation, Saint Petersburg, Universitetskaya embankment, 7–9

³ Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical
and Biological Agency

197376, Russian Federation, Saint Petersburg, Professora Popova str., 9

A series of amplitude and spectral studies was performed to investigate brain cortical activity in rats with traumatized brain (open penetrating traumatic brain injury (TBI)). Electro-corticograms (ECoG) were recorded on the 3rd and the 7th day following the trauma. An amplitude analysis comprised an estimation of the mean signal amplitude and the degree of Lempel — Ziv compression. A spectral analysis involved a calculation of the mean amplitude and δ -, θ -, α - and β -rhythm indices. Characteristic changes in the ECoG amplitude and spectral parameters were revealed in TBI rats. Traumatized animals demonstrated decreased values of both the mean signal amplitude, as well as the amplitudes and indices of θ -, α - and β -rhythms. At the same time, the mean amplitude and the index of delta-frequency were increased. Similar changes were observed not only near the traumatized area but also in the other brain cortex regions on the 3rd and 7th day following the trauma. The obtained results demonstrate that the investigated TBI model has numerous electrophysiological similarities with traumas in clinical practice, thus being applicable for neurophysiological and pharmacological studies.

Keywords: traumatic brain injury, electrocorticography, amplitude analysis, spectral analysis

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

For citation: Sysoev Yu.I., Kroshkina K.A., P'yankova V.A., Karev V.E., Okovitiy S.V. Amplitude and Spectral Analysis of Electro-corticograms in Rats with Traumatic Brain Injury. *Journal Biomed.* 2019;15(4):107–120. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-107-120>

Submitted 16.05.2019

Revised 25.10.2019

Published 10.12.2019

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является главной причиной инвалидизации и гибели пациентов молодого возраста. В связи с тем, что группой риска является наиболее трудоспособная и активная часть населения, данная проблема для общества имеет большое социально-экономическое значение [14].

Реабилитация пациентов после травматического или ишемического повреждения головного мозга включает в себя восстано-

ление нарушенных функций (двигательных, когнитивных и др.) как с помощью физических методов (ранняя вертикализация, ранняя мобилизация, постуральная коррекция, низкоинтенсивная физиотерапия), так и фармакологических [3]. Традиционно для коррекции неврологических расстройств предлагаются препараты, обладающие нейропротекторным и ноотропным действием. Однако, несмотря на большое разнообразие средств, продемонстрировавших эффективность в рамках доклиниче-

ских испытаний, лишь малая часть из них используется в клинической практике, что обусловлено их недостаточной эффективностью у пациентов неврологического профиля.

В связи с этим возникает необходимость более детального изучения и, главное, подтверждения нейропротекторной активности новых соединений на доклиническом этапе различными методами. Стандартом поиска и верификации нейро-реабилитационной активности новых молекул в эксперименте являются поведенческие и функциональные тесты [5, 18], гистологические [8] и биохимические исследования [9]. Все перечисленное хорошо зарекомендовало себя в нейрофармакологических исследованиях, однако каждый из подходов имеет свои недостатки. Так, например, тесты на координацию движений, память и т. д. у лабораторных грызунов часто являются субъективными, поскольку ряд ключевых показателей не может быть обработан компьютеризированными системами. Гистологические и биохимические исследования обычно невозможно проводить в динамике на одних и тех же животных.

Возможным связующим звеном общепризнанных направлений нейрофармакологических исследований могут быть нейрофизиологические методы. Среди последних классическим и наиболее изученным является электроэнцефалография (ЭЭГ) — регистрация биоэлектрической активности головного мозга. В экспериментальных исследованиях на лабораторных животных более распространен метод регистрации биологической активности мозга непосредственно «с коры» — электрокортикография (ЭКoГ). И хотя у данных методов, как и у любых других, есть свои недостатки, их несомненными достоинствами является возможность оценки функционального состояния мозга как единой взаимосвязанной системы.

Кроме того, важно, что тестирование испытуемых лабораторных животных можно проводить так часто и так долго, как это необходимо.

На сегодняшний день опубликовано небольшое количество статей, где бы авторами оценивалась возможность регистрации и анализа ЭЭГ на моделях черепно-мозговой травмы у животных для оценки эффективности новых нейропротекторных средств. Поэтому экспериментальная модель ЧМТ, позволяющая оценивать количественно и в динамике множество параметров, характеризующих состояние головного мозга, представляет несомненный интерес для нейрофармакологии. В связи с этим **целью** настоящей работы стал поиск изменений амплитудных и спектральных параметров электрокортикограмм, возникающих у крыс, перенесших черепно-мозговую травму.

Материалы и методы

Исследование проводили в соответствии с принципами Базельской декларации, Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и рекомендациями биоэтической комиссии СПХФУ. Крыс содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде. Все опытные и контрольные животные были взяты из одной партии и прошли карантин в течение 14-ти сут.

Эксперименты выполнены на 10-ти белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г, полученных из ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская область), разделенных на две группы (здоровую и контрольную). В обеих экспериментальных группах было по 5 животных.

Кортикографические электроды изготавливали из нихромовой проволоки диаметром 0,5 мм (для регистрирующих и референтного электродов) и диаметром

0,16 мм — для заземляющего электрода. Изоляцию осуществляли термоусадочной трубкой, длина регистрирующей (неизолированной) части ≈ 1 мм. Все электроды объединялись в гнездо на кабель BLS-8 с шагом 2,54 мм.

Для проведения хирургических манипуляций животных предварительно наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг). После подготовки поверхности черепа (удаление мышечно-фасциального слоя, надкостницы и коагуляции кровотокающих участков) просверливали отверстия соответствующих диаметров для электродов и фиксирующих винтов. Далее у крыс здоровой группы осуществляли имплантацию кортикографических электродов и вкручивание фиксирующих винтов в соответствующие отверстия, а у животных второй группы предварительно моделировали черепно-мозговую травму. Координаты расположения электродов определяли с помощью стереотаксического атласа мозга крысы [20]. Электроды FP1 и FP2 располагали в области, иннервирующей передние конечности (вторичная двигательная кора, AP=+2,0, ML=1,5, DV=1,0), C3 и C4 — иннервирующей задние конечности (первичная двигательная кора, AP=-1,0, ML=2,0, DV=1,0), а O1 и O2 — над гиппокампом (первичная соматосенсорная кора, AP=-4,0, ML=2,0, DV=1,0). Референтный электрод устанавливали в носовую кость, заземляющий — под кожу в области шеи.

Черепно-мозговую травму моделировали в соответствии с описанной ранее методикой [5, 12]. У животных проводили трепанацию черепа в левой лобной части над зоной сенсомоторной коры. Центр трепанационного отверстия находился на 2,0 мм роstralнее и 1,5 мм медиальнее брегмы. После этого в трепанационное отверстие помещали подвижный стальной поршень диаметром 3 мм с ходом 4 мм, по которому с высоты 10 см ударял скользящий в стальной трубке груз массой 50 г.

После этого высверленную пластину возвращали на место, имплантировали электроды и вкручивали фиксирующие винты. Дополнительную фиксацию конструкций в черепе осуществляли с помощью стоматологической пластмассы Виллакрил С (Zhermack, Италия). После этого ушивали разрез кожи, проводили антисептическую обработку швов и прилежащих областей.

Запись кортикографической активности животных осуществляли на 3-и и 7-е сут после операции с помощью 8-канального энцефалографа «Нейрон-Спектр-1» («Нейрософт», Россия). Из полученных 5-минутных кортикограмм отбирали участки записи, во время которых тестируемые животные находились в спокойном состоянии (отсутствие двигательной или исследовательской активности, а также груминга). Далее проводили амплитудный и спектральный анализы и сравнивали результаты двух экспериментальных групп. Амплитудный анализ включал в себя оценку средней амплитуды сигнала и степени его сжатия по Лемпелю — Зиву (степень сжатия по Лемпелю — Зиву характеризует повторяемость сигнала: чем повторяемость больше, тем степень сжатия выше). Для спектрального анализа проводили расчет величины средней амплитуды и индексов δ - (0,5–4,0 Гц), θ - (4,0–8,0 Гц), α - (8,0–14,0 Гц) и β -ритмов (низкочастотных, НЧ — 14,0–20,0 Гц, и высокочастотных, ВЧ — 20,0–35,0 Гц). Индекс ритма вычисляли как процент количества волн ЭКГ, принадлежащих δ -, θ -, α - или β -диапазону, за все анализируемое время записи. Длина эпохи анализа — 5 с.

Извлеченный головной мозг фиксировали 10% нормальным формалином в течение 24 ч. Для гистологического исследования фиксированный головной мозг вскрывался таким образом, чтобы вертикальный разрез проходил через середину очага травматического повреждения и через соответствующие отделы контрлатерального полушария.

Вырезались образцы ткани в виде пластин толщиной 0,2–0,3 см. Полученные образцы ткани подвергались гистологической проводке, пропитыванию и заливке в парафин по общепринятой методике. Из парафиновых блоков при помощи ротационного микротомы изготавливались срезы ткани, размещались на предметные стекла, окрашивались гематоксилином и эозином, после чего обезвоживались и заключались под покровные стекла. Гистологические препараты подвергались тотальному сканированию при помощи сканирующей системы для лабораторных исследований с комплектом программ для обработки изображений Panoramic MIDI (3D Histech Kft, Венгрия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы GraphPad Prism 7.00. Значимость различий оценивали с помощью непараметрического *U*-критерия Манна — Уитни. Для сравнения значений параметров ЭКоГ крыс на 7-е сут после операции с собственными значениями на 3-и сут использовали *T*-критерий Вилкоксона.

Результаты исследований

В результате нанесения контролируемого кортикального удара формировался очаг

повреждения, затрагивающий не только кору, но и подлежащие структуры головного мозга. Вокруг очага повреждения, представленного некротизированной мозговой тканью, на 7-е сут формировалась перифокальная демаркационная зона, представленная обильной полиморфноклеточной инфильтрацией и реактивными изменениями нейроглии (рис. 1).

Амплитудный анализ ЭКоГ. У крыс, перенесших черепно-мозговую травму, наблюдалось достоверное снижение средней амплитуды сигнала ЭКоГ во всех отведениях по сравнению со здоровой группой в среднем на 46% ($p < 0,05$, $p < 0,01$) на 3-й и на 65% ($p < 0,05$, $p < 0,01$) на 7-й дни соответственно (табл.).

Спектральный анализ ЭКоГ. Повреждение двигательной коры и нижележащих отделов на 3-й день после травмы приводило к увеличению средней амплитуды δ -ритма в зоне первичной двигательной коры (C3) со стороны травмы на 30% ($p < 0,05$). Индекс δ -ритма также достоверно увеличивался на 7-е сут в области вторичной двигательной коры как с поврежденной стороны (FP1) — на 41% ($p < 0,01$), так и со здоровой (FP2) — на 33% ($p < 0,05$). В области первичной двигательной коры наблюдалось достоверное увеличение дан-

Таблица 1. Средние амплитуды (мкВ) кортикографического сигнала здоровых и травмированных крыс на 3-ю и 7-ю сут после операции

Table 1. Mean amplitudes (μV) of the cortex signal in healthy and traumatized rats on the 3rd and 7th day following the surgery

Отведение	Средняя амплитуда на 3-й день, мкВ		Средняя амплитуда на 7-й день, мкВ	
	Здоровые	ЧМТ	Здоровые	ЧМТ
FP1	55,0±1,6	27,6±4,1**	51,4±1,5	37,8±4,5**
FP2	55,0±3,5	35,4±2,8**	51,2±1,6	41,2±2,9*
C3	73,2±4,2	36,8±2,1**	66,4±3,6	49,4±4,7*
C4	81,0±7,3	46,8±6,0**	72,0±4,1	54,8±7,4**
O1	90,2±2,5	45,4±5,2**	82,0±2,1	55,2±4,7**
O2	91,2±2,9	45,6±7,8**	79,8±2,6*	50,8±5,9**

Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ — достоверное отличие по сравнению со здоровой группой по *U*-критерию Манна — Уитни; # — $p < 0,05$ — по сравнению с собственными значениями на 3-й день после операции по *T*-критерию Вилкоксона.

Note: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ vs. healthy animals, Mann — Whitney *U*-test; # — $p < 0,05$ vs. results on the 3rd day following operation using Wilcoxon *T*-test.

ного показателя только со стороны травмы (С3) на 47% ($p < 0,01$). В области первичной соматосенсорной коры над гиппокампом индекс δ -ритма достоверно увеличивался с поврежденной (O1) и здоровой (O2) сторон на 48% ($p < 0,05$) и 40% ($p < 0,01$) соответственно (рис. 2–4).

У крыс с ЧМТ средняя амплитуда θ -ритма на 3-и сут уменьшалась во всех отведениях в среднем на 38% ($p < 0,05$, $p < 0,01$), а на 7-е сут — в области первичной соматосенсорной коры с поврежденной (O1) и здоровой стороны (O2) на 28% ($p < 0,01$) и 29% ($p < 0,05$) соответственно. Индекс θ -ритма у травмированных крыс также снижался: на 3-й день в области первичной двигательной коры на стороне травмы (С3) на 39% ($p < 0,01$) и в области первичной сенсомоторной коры над гиппокампом на здоровой стороне (O2) на 28% ($p < 0,05$) (рис. 2–4).

У травмированных крыс по сравнению со здоровой группой на 3-й день по всем отведениям наблюдалось достоверное снижение средней амплитуды α -ритма в диапазоне от 40 до 59% ($p < 0,05$, $p < 0,01$) и на 7-й день — в среднем на 31% ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Индекс α -ритма достоверно снижался на 3-й день в области вторичной двигательной коры с поврежденной стороны (FP1) на 65% ($p < 0,01$), со здоровой (FP2) — на 50% ($p < 0,01$); в области первичной двигательной коры с поврежденной стороны (С3) — на 70% ($p < 0,01$), со здоровой (С4) — на 46% ($p < 0,05$); в области первичной соматосенсорной коры с поврежденной стороны (O1) — на 74% ($p < 0,01$), а со здоровой (O2) — на 61% ($p < 0,01$). Аналогично на 7-й день: в области вторичной двигательной коры с поврежденной стороны (FP1) — на 41% ($p < 0,01$), со здоровой (FP2) — на 32% ($p < 0,01$); в об-

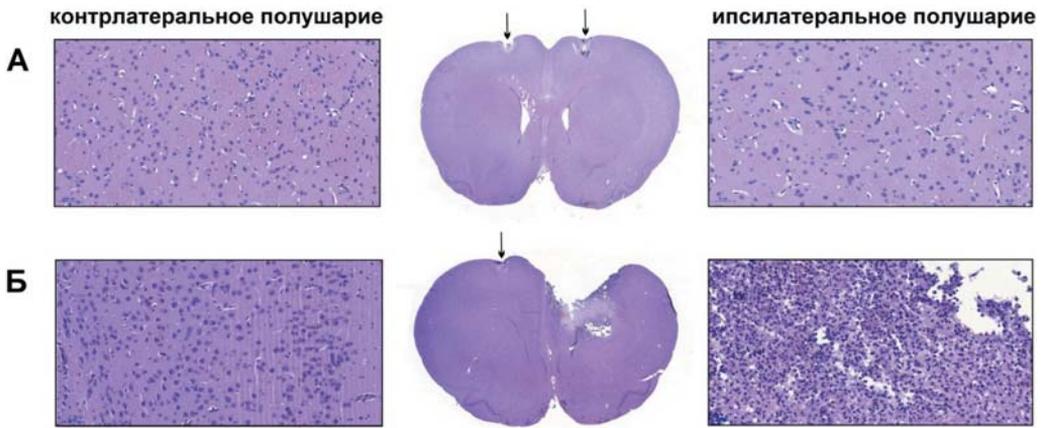


Рис. 1. Срезы мозга тестируемых животных на 7-е сут после травмы. Окраска гематоксилином и эозином. А — здоровая группа, Б — группа животных с ЧМТ. На срезах мозга животного, перенесшего черепно-мозговую травму, видна зона повреждения, затрагивающая не только область коры, но и подлежащие структуры (Б, средний рисунок, ув. $\times 5$). Очаг повреждения окружен широкой зоной перифокального экссудативного воспаления, представленного обильной полиморфноклеточной воспалительной инфильтрацией (Б, правый рисунок, ув. $\times 200$). В кортикальных отделах лобных долей у животных из обеих групп видны углубления от ЭCoГ электродов (А, Б, средние рисунки, обозначены стрелками).

Fig. 1. Brain slice preparations from experimental animals on the 7th day following the surgery. Hematoxylin and eosin staining. А — healthy rats, Б — rats with traumatic brain injury. The injury zone, which affects not only the cortical region but also the underlying structures, is clearly seen in a brain slice preparation obtained from a traumatized rat (Б, the middle figure, $\times 5$). The lesion is surrounded by a wide area of perifocal exudative inflammation, represented by abundant polymorphic cell inflammatory infiltration (Б, right figure, $\times 200$). Holes from ECoG electrodes are visible in the cortical sections of the frontal lobes of animals from both groups, (А, Б, middle figures, indicated by arrows).

ласти первичной двигательной коры с поврежденной коры (С3) — на 40% ($p < 0,01$); в области первичной сенсомоторной коры со здоровой стороны (О2) — на 25% ($p < 0,05$) (рис. 2–4).

Черепно-мозговая травма у крыс приводила к достоверному снижению средней амплитуды β -НЧ-ритма как с поврежденной, так и здоровой стороны на 3-и и на 7-е сут в среднем на 50 и 36% соответственно ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Аналогичная тенденция к снижению наблюдалась и у индекса β -НЧ-ритма как на 3-й, так и на 7-й день. На 3-и сут наблюдалось уменьшение индекса β -НЧ-ритма во всех отведениях в среднем на 53% и на 7-й день — на 34% ($p < 0,05$, $p < 0,01$) (рис. 2–4).

Также у крыс с ЧМТ во всех отведениях наблюдалось достоверное снижение средней амплитуды β -ВЧ-ритма на 3-й и на 7-й день на 38 и 32% соответственно ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Аналогично наблюдалось достоверное уменьшение индекса β -ВЧ-ритма на 3-й день в области вторичной двигательной коры на 52% ($p < 0,01$) с поврежденной (FP1) и на 34% ($p < 0,05$) со здоровой (FP2) стороны, а также только с поврежденной стороны в области вторичной двигательной коры (С3) и первичной сенсомоторной (О1) на 64% ($p < 0,01$) и на 62% ($p < 0,01$) соответственно. На 7-е сут наблюдалось достоверное снижение индекса β -ВЧ-ритма только с поврежденной стороны в области вторичной (FP1) и первичной (С3) двигательной, а также первичной сенсомоторной (О1) коры на 50% ($p < 0,01$), 50% ($p < 0,01$) и 22% ($p < 0,01$) соответственно (рис. 2–4).

Анализ динамики амплитудно-спектральных характеристик электрокортикограмм. С 3-го на 7-й день средняя амплитуда и индекс δ -ритма в области первичной двигательной коры с поврежденной стороны (С3) в группе травмированных жи-

вотных достоверно уменьшились на 32% ($p < 0,05$) и 30% ($p < 0,05$) соответственно (рис. 2–4). Средняя амплитуда α -ритма достоверно увеличивалась в зоне вторичной двигательной коры с поврежденной стороны (FP1) на 30% ($p < 0,05$) и со здоровой стороны (FP2) — на 20% ($p < 0,05$), с травмированной стороны в зоне первичной двигательной коры (С3) — на 31% ($p < 0,05$) и в зоне первичной сенсомоторной коры (О1) — на 28% ($p < 0,01$) в группе ЧМТ на 7-е сут по сравнению с 3-ми. Индекс α -ритма в динамике с 3-х на 7-е сут в группе травмированных животных достоверно увеличивался со стороны повреждения в области вторичной двигательной коры (FP1) на 35% ($p < 0,05$), в области первичной двигательной коры (С3) — на 48% ($p < 0,05$), в области первичной сенсомоторной коры (О1) — на 59% ($p < 0,05$), а со здоровой стороны только в области первичной сенсомоторной коры (О2) — на 42% ($p < 0,05$) (рис. 2–4). Также наблюдалось достоверное увеличение средней амплитуды и индекса β -НЧ-ритма на 7-й день по сравнению с 3-м в группе травмированных животных: средняя амплитуда достоверно увеличивалась со стороны травмы в области первичной двигательной коры (С3) и первичной сенсомоторной коры (О1) на 26% ($p < 0,05$) и 24% ($p < 0,05$) соответственно, а индекс β -НЧ-ритма достоверно увеличивался в области первичной сенсомоторной коры со стороны травмы (О1) на 52% ($p < 0,05$) (рис. 2–4). Аналогично в отношении β -ВЧ-ритма: со стороны травмы достоверно увеличивалась средняя амплитуда в области первичной двигательной коры (С3) на 23% ($p < 0,05$) и в области первичной сенсомоторной коры (О1) на 25% ($p < 0,05$), индекс ритма достоверно увеличивался в области первичной сенсомоторной коры (О1) на 52% ($p < 0,05$) в группе ЧМТ в динамике с 3-го на 7-й день (рис. 2–4).

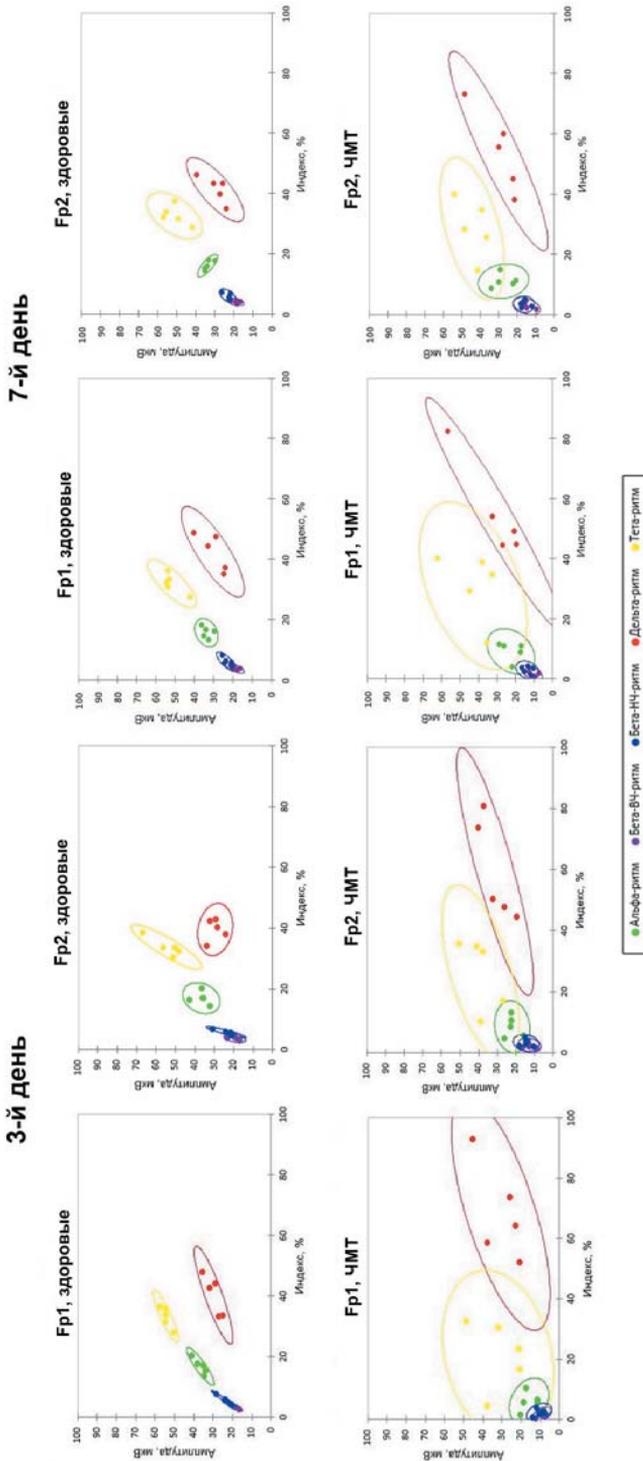


Рис. 2. Амплитудно-спектральные характеристики ЭCoГ здоровых и травмированных крыс в области вторичной двигательной коры (отведения FP1 и FP2) на 3-и и 7-е сутт после операции.
Fig. 2. Amplitude-spectral ECoG characteristics of healthy and traumatized rats in the secondary motor cortex (FP1 and FP2) on the 3rd and 7th day following the surgery.

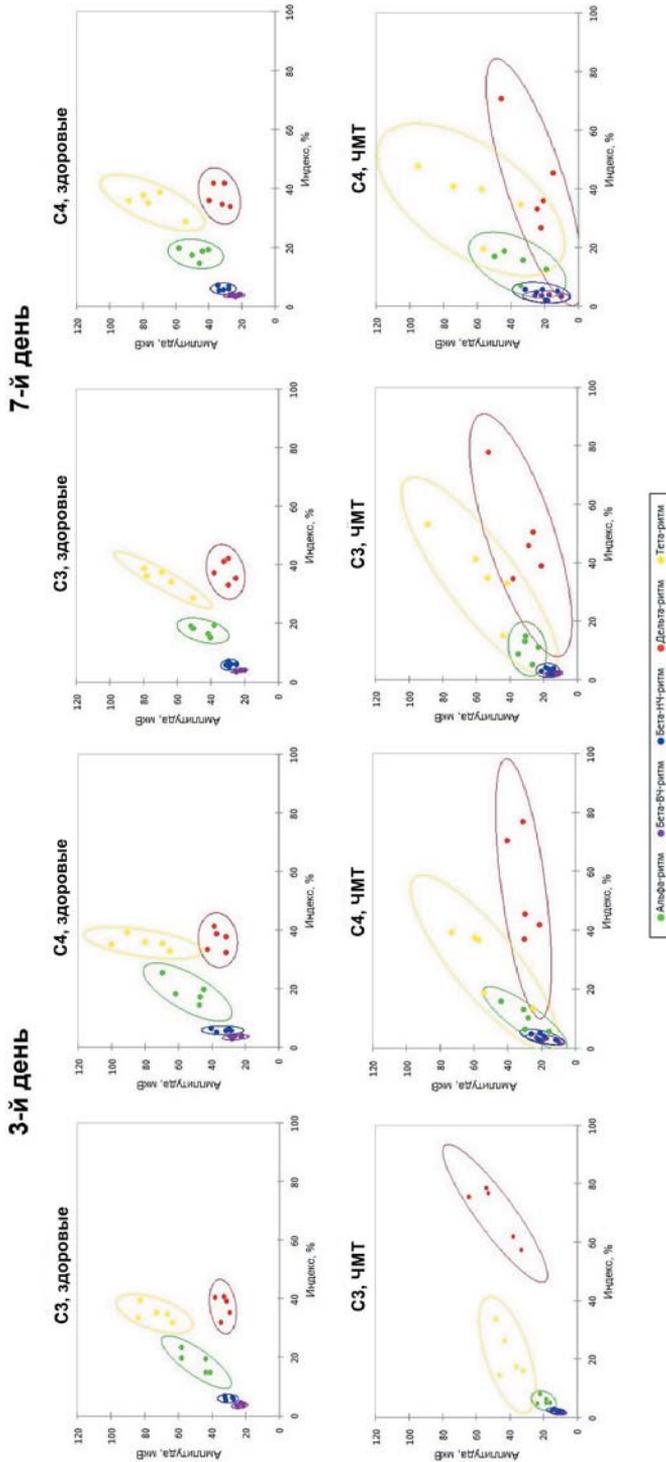


Рис. 3. Амплитудно-спектральные характеристики ЭКоГ здоровых и травмированных крыс в области первичной двигательной коры (отведения С3 и С4) на 3-й и 7-е сут после операции.

Fig. 3. Amplitude-spectral ECoG characteristics of healthy and traumatized rats in the primary motor cortex (C3 and C4) on the 3rd and 7th day following the surgery.

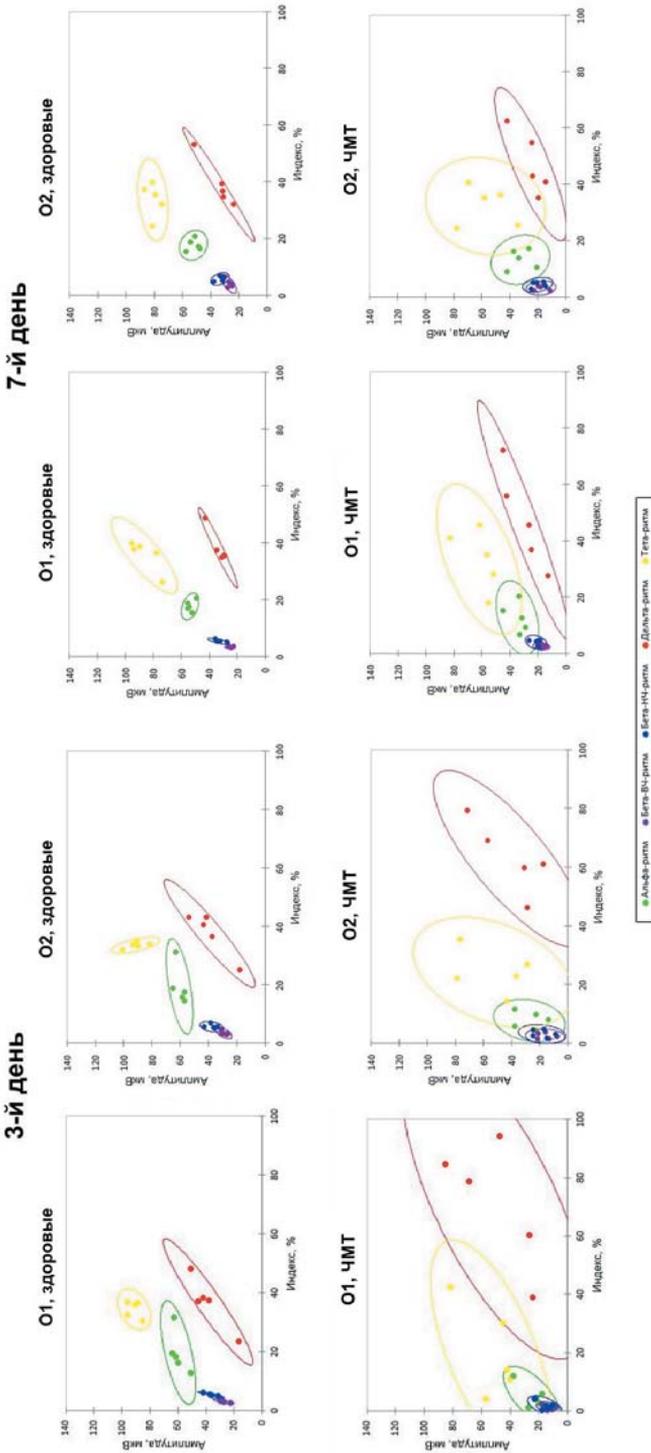


Рис. 4. Амплитудно-спектральные характеристики ЭЖГ здоровых и травмированных крыс в области первичной соматосенсорной коры (отведения O1 и O2) на 3-и и 7-е сут после операции.
Fig. 4. Amplitude-spectral characteristics of healthy and traumatized rats in the primary motor cortex (O1 and O2) on the 3rd and 7th day following the surgery.

Обсуждение результатов

В настоящем исследовании у здоровых крыс в норме в области первичной и вторичной двигательной коры преобладали δ -, а в области первичной соматосенсорной коры, расположенной над гиппокампом, — θ -ритмы. Наибольшую амплитуду наблюдали у θ -ритмов.

ЧМТ у крыс приводила к увеличению индекса и амплитуды δ -ритмов во всех отведениях, в то время как у остальных ритмов данные показатели снижались. Сходные изменения в виде уменьшения средней амплитуды сигнала биопотенциалов мозга на фоне его травматического повреждения описаны на модели жидкостно-перкуSSIONного удара у крыс и являются ее характерной особенностью [13]. Используемая нами модель ЧМТ инициирует множество патофизиологических процессов с поражением не только двигательной коры, но и нижележащих отделов, и, следовательно, увеличение активности низкочастотных ритмов является логичным для электрокортикограмм травмированных животных.

δ -активность (0,5–4,0 Гц) у людей может регистрироваться как в норме (например, во время сна), так и в случае патологии, свидетельствуя о нарушении функционального состояния мозга. Причинами увеличения амплитуды и индекса δ -ритмов могут быть гипоксия, нарушения метаболизма и дисциркуляторные расстройства в системах ликворообращения и кровообращения, патологические состояния базолатеральных отделов миндалин или заднего гипоталамуса, поражения в области базальных систем переднего мозга, поражения мозжечка и многие другие [1]. Повышение мощности δ -ритмов и снижение преобладающих в нормальном бодрствующем состоянии α -ритмов описано для пациентов, перенесших травматическое повреждение головного мозга как в острый (первые часы-недели) [17, 22], так и в подострый периоды (недели-месяцы) [15]. Кроме

того, аналогичные изменения наблюдали и в хронический период (спустя 1–6 мес. после травмы) [19].

Известно, что θ -активность (колебания частотой 4,0–8,0 Гц) у человека и животных имеет различное происхождение, поэтому экспериментальные результаты нельзя непосредственно использовать в клинической практике. Однако поскольку генератором θ -ритмов у крыс является гиппокамп [23], снижение активности данных ритмов в нашем исследовании при унилатеральном фокальном травматическом поражении коры и нижележащих структур свидетельствует о функциональном угнетении этой структуры головного мозга, притом как с ипси-, так и с контрлатеральной стороны.

У человека θ -ритмы преобладают в детском возрасте, пока еще не сформирована α -активность. У здоровых взрослых такая активность не является патологической, если она нерегулярная и низкоамплитудная. Кроме того, показана её положительная корреляция с отдельными эмоциональными состояниями [4]. В остальных случаях увеличение амплитуд и индексов этих колебаний является признаком патологии, например поражения коры больших полушарий [1].

Колебания с частотой 8,0–14,0 Гц (α -ритм) — основной компонент «нормальной» ЭЭГ. В нашем эксперименте у здоровых крыс амплитуда этих ритмов увеличивалась по мере приближения к затылочной коре, а при травме уменьшалась во всех отведениях.

У человека α -ритм максимально выражен в задних (затылочной и теменной) областях коры больших полушарий мозга и генерируется за счет ритмических, импульсных посылок со стороны зрительного бугра [6]. Ослабление α -активности — уменьшение индекса, амплитуды колебаний, замедление ритма — обычно сопутствует локальным или диффузным поражениям самой коры больших полушарий, а также

негрубым поражениям различных уровней ствола мозга [1].

В проведенном исследовании при травме у животных было выявлено уменьшение β -ритмов (как β -НЧ, так и β -ВЧ). У человека β -НЧ (14,0–20,0 Гц) ритмы могут быть связаны с двигательной деятельностью или же эпилептичностью [7]. Кроме того, эти ритмы могут возникать при поражениях ствола в области III желудочка и гипоталамуса [1]. β -ВЧ (20,0–35,0 Гц) ритмы у человека — обязательный компонент ЭЭГ, исчезающий лишь при смерти мозга. В норме они имеют малую амплитуду, лучше выражены в передних (лобной, центральной) областях мозга [1]. Показана непосредственная связь β -ВЧ активности с деятельностью ретикулярной формации ствола мозга [2].

В проведенном исследовании продемонстрировано спонтанное частичное восстановление нормальных показателей амплитудных и спектральных характеристик ЭКоГ крыс на 7-е сут после ЧМТ. Это может быть связано с посттравматическим нейрогенезом, характерным для грызунов, продемонстрированным ранее на различных моделях травмы, включая используемую нами модель контролируемого кортикального удара [11, 16], а также на модели жидкостно-перкуSSIONного удара [10, 21] и модели с использованием падающего груза [11].

Таким образом, у тестируемых нами крыс с ЧМТ наблюдали изменения амплитудных и спектральных параметров ЭКоГ, описанные для др. моделей и, что наиболее важ-

но, для пациентов в клинической практике. Следовательно, предлагаемая нами модель адекватно воспроизводит функциональные изменения, возникающие при травматическом повреждении головного мозга.

Выводы

1. Одностороннее травматическое повреждение зоны двигательной коры и нижележащих отделов у крыс приводит к характерным изменениям величин амплитудно-спектральных параметров ЭКоГ:

- достоверному снижению средней амплитуды сигнала (до 65%);
- статистически значимому повышению амплитуды и индекса δ -ритма (до 30 и 48% соответственно) и снижению данных показателей θ - (до 38 и 39% соответственно), α - (до 59 и 74% соответственно) и β -ритмов (до 50 и 64% соответственно).

2. Описанные изменения фиксируются как в области удара (вторичная двигательная кора), так и в областях первичной двигательной и соматосенсорной коры головного мозга и на 3-и, и на 7-е сут после травмы.

3. На данной модели ЧМТ у крыс к 7-му дню происходит спонтанное частичное восстановление амплитуды и индексов ритмов волн ЭКоГ до значений, близких к значениям здоровых животных, о чем свидетельствует сравнительный анализ параметров ЭКоГ в разные периоды после травмы.

4. Промежуток с 3-х по 7-е сут является оптимальным для тестирования электрической активности головного мозга у крыс с ЧМТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Жирмунская Е.А. *Клиническая энцефалография*. М.: МЭЙБИ, 1991. 118 с. [Zhirmunskaya E.A. *Klinicheskaya encefalografiya [Clinical encephalography]*. Moscow: MEJBI Publ. 1991. 118 p. (In Russian)].
2. Могилевский А.Я. Влияние стимуляции заднего гипоталамуса на ЭЭГ неокортекса. *Ж. Высш. нервн. деят.* 1971;21(6):1268–1278. [Mogilevskij A.Ya. Vliyanie stimulyacii zadnego gipotalamusa na EEG neokorteksa [The influence of posterior hypothalamus stimulation on neocortex EEG]. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti [J. of Higher Nervous Activity]*. 1971;21(6):1268–1278. (In Russian)].
3. *Рекомендации по ведению больных с ишемическим инсультом и транзиторными ишемическими атаками*. ESO, 2008. [Rekomendacii po

- vedeniyu bol'nyh s ishemicheskim insultom i tranzitornymi ishemicheskimi atakami [Recommendations for the patients with ischemic stroke and transient ischemic attacks management]. ESO, 2008. (In Russian)].
4. Симонов П.В. Эмоциональный мозг. М.: Наука, 1980. 166 с. [Simonov P.V. *Emocionalnyj mozg [Emotional brain]*. Moscow: Nauka, 1980. 166 p. (In Russian)].
 5. Сысоев Ю.И., Дагаев С.Г., Кубарская Л.Г., Гайкова О.Н., Узугбунам Б.Ч., Модисе К. и др. Нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Биомедицина*. 2019;15(1):62–77. [Sysoev Yu. I., Dagaev S.G., Kubarskaya L.G., Gaikova O.N., Uzuegbunam B.C., Modise K., et al. Nejiroprotektornaya aktivnost' agonista alfa-2 adrenoreceptorov mafedina na modeli cherepno-mozgovoij travmy u krysv [Study of the neuroprotective activity of mafedine, an alpha-2 adrenergic receptor agonist, by modeling a traumatic brain injury in rats]. *Biomedicine*. 2019;15(1):62–77. (In Russian)].
 6. Andersen R., Anderson S. *Physiological basis of the alpha rhythm*. New York: Appleton-Century Crofts, 1968. 384 p.
 7. Brumback R.A., Staton R.D. Beta-activity an electrical seizure phenomena. *EEG Clin. Neurophysiol.* 1981;52(3):128.
 8. Chen S.F., Hsu C.W., Huang W.H., Wang J.Y. Post-injury baicalein improves histological and functional outcomes and reduces inflammatory cytokines after experimental traumatic brain injury. *Br. J. Pharmacol.* 2008;155(8):1279–1296.
 9. Chen X., Wu S., Chen C., et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation attenuates microglial-induced inflammation by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF-κB pathway following experimental traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation*. 2017;14(1):143.
 10. Chirumamilla S., Sun D., Bullock M.R., Colello R.J. Traumatic brain injury induced cell proliferation in the adult mammalian central nervous system. *J. Neurotrauma*. 2002;19(6):693–703.
 11. Dash P.K., Mach S.A., Moore A.N. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.* 2001;63(4):313–319.
 12. Dixon C.E., Clifton G.L., Lighthall J.W., et al. Controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J. Neurosci. Methods*. 1991;39(3):253–262.
 13. Dixon C.E., Lyeth B.G., Povlishock J.T., et al. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J. Neurosurg.* 1987;67(1):110–119.
 14. Faul M., Coronado V. *Handbook of clinical neurology. Vol. 127. Traumatic brain injury. Part 1*. 2015. P. 1–13.
 15. Fenton G., McClelland R., Montgomery A., et al. The postconcussional syndrome: social antecedents and psychological sequelae. *Br. J. Psychiatry*. 1993;162:493–497.
 16. Gao X., Enikolopov G., Chen J. Moderate traumatic brain injury promotes proliferation of quiescent neural progenitors in the adult hippocampus. *Exp. Neurol.* 2009;219(2):516–523.
 17. Gosselin N., Lassonde M., Petit D., et al. Sleep following sport-related concussions. *Sleep Med.* 2009;10(1):35–46.
 18. Isaev N.K., Novikova S.V., Stelmashook E.V., et al. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant skqr1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat. *Biochemistry (Moscow)*. 2012;77(9):996–999.
 19. Korn A., Golan H., Melamed I., Pascual-Marqui R., Friedman A. Focal cortical dysfunction and blood-brain barrier disruption in patients with Postconcussion syndrome. *J. Clin. Neurophysiol.* 2005;22(1):1–9.
 20. Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th edition. Academic press, 2007. P. 456.
 21. Rice A.C., Khaldi A., Harvey H.B., et al. Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 2003;183(2):406–417.
 22. Tebano M.T., Camerini M., Gallozzi G., et al. EEG spectral analysis after minor head injury in man. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1988;70(2):185–189.
 23. Vanderwolf C.H. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1969;26(4):407–418.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Сысоев Юрий Игоревич*, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России; Институт трансляционной биомедицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;
e-mail: susoyev92@mail.ru

Yuriy I. Sysoev*, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Institute of Translational Biomedicine of the Saint-Petersburg State University;
e-mail: susoyev92@mail.ru

Крошкина Ксения Алексеевна, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: ksenija.kroshkina@pharminnotech.com

Пьянкова Валентина Андреевна, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: pyankova2@mail.ru

Карев Вадим Евгеньевич, к.м.н., ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»;
e-mail: vadimkarev@yandex.ru

Оковитый Сергей Владимирович, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;
e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

Kseniya A. Kroshkina, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: ksenija.kroshkina@pharminnotech.com

Valentina A. P'yankova, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: pyankova2@mail.ru

Vadim E. Karev, Cand. Sci. (Med.), Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical and Biological Agency;
e-mail: vadimkarev@yandex.ru

Sergey V. Okovityi, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation;
e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Лабораторкорм

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

Реализуем:

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

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



Доставка в любой регион России

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

ООО «Лабораторкорм»

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

www.laboratorkorm.ru

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства»
Филиал «Андреевка»**

Филиал «Андреевка» образован на базе Центрального питомника лабораторных животных АМН СССР, который, в свою очередь, был создан в 1959 году. С тех пор основной задачей филиала «Андреевка» является получение и выращивание лабораторных животных. Филиал обеспечивает своих потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируемые по генетическим, физиологическим, морфологическим показателям состояния здоровья. Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев). С Филиалом сотрудничают более 200 потребителей лабораторных животных из России и стран СНГ. Основными потребителями являются научно-исследовательские учреждения РАН, Министерства здравоохранения РФ, Министерства обороны РФ, учебные заведения медико-биологического профиля.

Филиал «Андреевка» предлагает различных лабораторных животных. В их числе:
морские свинки;
генетически контролируемые колонии белых мышей (SHK, ICR) и крыс;
линейные мыши и крысы;
межлинейные гибриды мышей.

Адрес: 141551, Московская обл., Солнечногорский р-н, р/п. Андреевка, д. 49
телефон: +7(495)536-09-18; факс: +7(495)536-27-99
сайт: <http://www.andreevka.msk.ru/product.htm>

