

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

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

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 18

2022

2





15 апреля 2022 года
отметил 50-летний юбилей
директор Научного центра
биомедицинских технологий
Федерального
медико-биологического
агентства

**Владислав Николаевич
КАРКИЩЕНКО**



В.Н. Каркищенко родился 15.04.1972 года в г. Ростов-на-Дону. Окончил среднюю школу № 147 города Москвы и Московский медицинский стоматологический институт (в настоящее время – Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова).

В 1998 году защитил кандидатскую диссертацию в области космической фармакологии. Продолжил научную деятельность в сфере исследования лекарственной профилактики стресса, комбинированной иммунопрофилактики при стрессе, изучения фармакокинетики различных лекарственных форм интерферона человека. В 2005 году защитил докторскую диссертацию по теме: «Фармакологический анализ и регуляция адаптогенеза при комбинированном стрессе» по специальности «фармакология, клиническая фармакология». В 2009 году было присвоено учёное звание профессора по данной специальности.

С 2013 года работает в должности директора Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). В 2020 году назначен главным внештатным специалистом клиническим фармакологом ФМБА России.

Каркищенко В.Н. – автор и соавтор 11 научных монографий и руководств, специализированного учебного пособия, более 200 научных статей, 25 патентов на лекарственные средства и медицинские технологии, из которых 4 международных. Под его научным руководством защищено 6 кандидатских и 2 докторских диссертации.

Основными направлениями научной деятельности В.Н. Каркищенко являются разработка и внедрение биомедицинских методов и технологий, создание новых лекарственных средств и фармнутриентов для спецконтингентов и гражданского населения. В.Н. Каркищенко координирует научную работу Центра в области биобезопасности. При его непосредственном участии проводится экспериментальная работа по изучению свойств, эффективности и биобезопасности различных веществ, в том числе созданных на основе нанотехнологий.

В.Н. Каркищенко является постоянным членом Дисциплинарного антидопингового комитета РУСАДА, заместителем главного редактора научного журнала «Биомедицина», членом редколлегии научного журнала «Спортивная медицина: наука и практика».

Награжден медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени (2014); медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» I степени (2019) и ведомственными знаками отличия: медалью «За заслуги в создании вооружения» (РАРАН, 2000), медалью ФМБА России «За отличие в медицинском обеспечении спортсменов сборных команд России» (2014), нагрудным знаком «Золотой крест ФМБА России» (2021).



От всей души поздравляем Владислава Николаевича с юбилеем и желаем ему крепкого здоровья, счастья, благополучия, новых творческих успехов и достижения всех намеченных целей!

*Коллектив НЦБМТ ФМБА России,
редакция журнала «Биомедицина»*



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2022, Том 18, № 2

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

JOURNAL BIOMED

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.
Quarterly.

2022, Vol. 18, No. 2

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

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

■ Главный редактор

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

■ Заместители главного редактора

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

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н.

■ Ответственный секретарь

Алимкина Оксана Владимировна

■ Члены редакционного совета

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

История издания журнала:	Журнал издается с 2005 г.
Периодичность:	4 выпуска в год
Префикс DOI:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Свидетельство о регистрации СМИ:	Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати. Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 от 09.06.2005
Индексация:	Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук
Подписной индекс:	57995 в объединенном каталоге «Пресса России»
Стоимость одного выпуска:	400 руб.
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Учредитель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Издатель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Редакция:	143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1 Тел.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Тираж:	3000 экземпляров
Типография:	ООО «БЕАН» 603003, Нижегородская обл., Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1
Дата выхода в свет:	10.06.2022

JOURNAL BIOMED

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

■ Editor-in-Chief

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

■ Deputy Editors-in-Chief

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

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

■ Executive Secretary

Oksana V. Alimkina

■ Members of Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JOURNAL BIOMED

Founded:	The journal has been published since 2005.
Frequency:	Quarterly
DOI Prefix:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Mass media registration certificate:	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 of 09.06.2005
Indexing:	The Journal is included into the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading per-reviewed scientific journals recommended for publishing the basic research results of doctor and candidate theses)
Subscription index:	57995 in the combined catalogue "Pressa Rossii"
Price:	400 RUR
Content distribution terms:	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Founders:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1
Publisher:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Circulation:	3000 copies
Printing house:	BEAN, LLC. 603003, Russian Federation, Nizhny Novgorod Region, Nizhny Novgorod, Barrikad Street, 1
Publication date:	10.06.2022

■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Д.А. Ксенофонтов, А.А. Ксенофонтова

Влияние пищеварительного тракта на динамику активности ферментов 10

Е.И. Лебедева, А.С. Бабенко, А.Т. Щастный

Динамика стабильности экспрессии генов *sdha*, *hpvt*, *prl3d1* и *hes1* в рамках моделирования фиброза печени крыс 17

А.А. Мокрушин

Метод получения и изучения гелевого раствора с агаром для сохранения электрической активности срезов мозга крыс после их длительного криосохранения . . 31

■ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

**Т.С. Литвиненко, А.В. Сафроненко, Ю.С. Макляков, Е.В. Ганцгорн,
Е.С. Постникова, М.О. Гайсаев, В.Г. Брижак**

Анализ спонтанных сообщений как «инструмент» фармаконадзора 40

**Е.К. Мелоян, А.В. Сафроненко, Е.В. Ганцгорн, В.И. Полякова, С.Д. Стагниец,
А.А. Ильина, Е.Ю. Романова**

Хронический компенсированный тонзиллофарингит: клиничко-микробиологические особенности 46

■ БИОРЕГУЛЯТОРЫ В МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЯХ

И.Б. Сухов, О.В. Чистякова

Влияние интраназально вводимого инсулина на Na^+/K^+ -АТФазу и компоненты Ca^{2+} -транспортирующей системы в кардиомиоцитах у крыс с сахарным диабетом 1-го типа 52

■ РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

И.А. Демьяненко, А.В. Шишкина, Ю.С. Хац, Н.В. Калмыкова

Сравнительное исследование инъекционных имплантатов на основе микрочастиц различных биodeградируемых материалов в модели подкожной имплантации у мышей. 63

■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

Dmitriy A. Ksenofontov, Anzhelika A. Ksenofontova

Influence of the Digestive Tract on the Dynamics on Enzyme Activity 10

Elena I. Lebedeva, Andrei S. Babenko, Anatoly T. Shchastny

Stability of the *sdha*, *hpvt*, *prl3d1*, and *hes1* Gene Expression
in a Rat Liver Fibrosis Model 17

Anatoliy A. Mokrushin

A Method for Obtaining and Studying a Gel Agar-Based Medium to Preserve
the Electrical Activity of Rat Brain Slices after their Long-Term Cryopreservation 31

■ BIOMEDICAL TECHNOLOGIES IN CLINICAL RESEARCH

**Tatyana S. Litvinenko, Andrey V. Safronenko, Yuri S. Maklyakov, Elena V. Gantsgorn,
Elena S. Postnikova, Magomed O. Gaisaev, Victoria G. Brizhak**

Analysis of Spontaneous Reports as a Methodological Pharmacovigilance Tool 40

**Elena K. Meloyan, Andrey V. Safronenko, Elena V. Gantsgorn, Viktoriya I. Polyakova,
Stanislav D. Stagniev, Alisa A. Ilyina, Ekaterina Yu. Romanova**

Chronic Compensated Tonsillopharyngitis: Clinical and Microbiological Features 46

■ BIOREGULATORS IN MEDICAL TECHNOLOGIES

Ivan B. Sukhov, Oxana V. Chistyakova

Impact of Intranasal Insulin Administration On Na^+/K^+ -Atpase and Ca^{2+} -Transporting System
Components in Rat Cardiomyocytes with Type 1 Diabetes Mellitus 52

■ RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

Ilya A. Demyanenko, Anna V. Shishkina, Yulia S. Hats, Nina V. Kalmykova

Comparative Study of Injectable Implants Based on Microparticles of Various Biodegradable
Materials in a Murine Model of Subcutaneous Implantation 63



ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА НА ДИНАМИКУ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Д.А. Ксенофонтов*, А.А. Ксенофонтова

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева»
127550, Российская Федерация, Москва, ул. Тимирязевская, 49

В эксперименте на кроликах и мини-пигах исследована активность ферментов на уровне пищеварительного тракта. Получены результаты активности ферментов в крови, притекающей и оттекающей от желудка и кишечника кролика. Артериовенозная разница выявила снижение активности лактатдегидрогеназы и амилазы при возрастающей активности щелочной фосфатазы у кроликов. Установлена закономерность изменения активности гамма-глутамилтрансферазы в слизистой оболочке кишечника и во фракциях химуса. В слизистой оболочке стенки тонкого кишечника активность трансферазы снижается в дистальном направлении. Максимальная её активность выявлена в растворимой фракции химуса тонкого кишечника, с характерной динамикой снижения в дистальном направлении. С учётом гидратации гликопротеинов полостной слизи в химусе и его существования в виде своеобразной энтероплазмы предполагается закономерная локализация фермента в энтеральной среде между растворимой и плотной эндогенной фракцией с целью проявления максимальной транспортной активности. Сделано заключение о плазмоформирующей роли пищеварительного тракта в части активности ферментов крови.

Ключевые слова: кишечник, химус, кровь, фермент, амилаза, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтрансфераза

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Ксенофонтов Д.А., Ксенофонтова А.А. Влияние пищеварительного тракта на динамику активности ферментов. *Биомедицина*. 2022;18(2):10–16. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-10-16>

Поступила 01.04.2022

Принята после доработки 17.05.2022

Опубликована 10.06.2022

INFLUENCE OF THE DIGESTIVE TRACT ON ENZYME ACTIVITY

Dmitriy A. Ksenofontov*, Anzhelika A. Ksenofontova

Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy
127550, Russian Federation, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49

Enzyme activity at the digestive tract level was experimentally studied on rabbits and mini-pigs. The enzyme activity in the blood flow supplied to and from the rabbit stomach and intestines was assessed. In rabbits, the arteriovenous oxygen difference revealed a decrease in the lactate dehydrogenase and amylase activity under an increase in the alkaline phosphatase activity. A regular dependence in the dynamics of gamma-glutamyl transferase activity in the intestinal mucosa and chyme fractions was established. It was found that gamma-glutamyl transferase activity decreases in the distal direction in the mucosa of the small intestine wall. Its maximum activity was determined in the soluble fraction of the small intestine chyme, with a characteristic decrease in the distal direction. Due to the hydration of the cavitary mucus glycoproteins in the chyme and the existence of the latter in the form of an enteroplasm, the enzyme is assumed

to localize in the enteric medium between the soluble and dense endogenous fraction with the purpose of displaying the maximum transport activity. A conclusion was made about the plasma-forming role of the digestive tract in terms of blood enzyme activity.

Keywords: intestine, chyme, blood, enzyme, amylase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase

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

For citation: Ksenofontov D.A., Ksenofontova A.A. Influence of the Digestive Tract on Enzyme Activity. *Journal Biomed.* 2022;18(2):10–16. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-10-16>

Submitted 01.04.2022

Revised 17.05.2022

Published 10.06.2022

Введение

В живых системах деструкция веществ и создание из их фрагментов новых компонентов, адаптированных к изменившимся условиям окружающей среды, осуществляется благодаря энзимам. Этот непрерывный круговорот веществ у животных происходит в т.ч. благодаря пищеварительной системе, имеющей сложную структурно-функциональную организацию гидролитических и транспортных механизмов, которая мгновенно передаёт информацию в центральное звено саморегуляции поддержания гомеостаза внутренней среды организма для включения адаптационных механизмов.

Основные фундаментальные представления о системе пищеварения сложились во второй половине XIX века на основе классических работ немецких и русских физиологов и, прежде всего, И.П. Павлова. Несмотря на открытое в конце 1950-х гг. пристеночное пищеварение, полостное пищеварение по-прежнему остаётся наименее изученным звеном пищеварительной системы. Данное ещё в 1924 г. Е.С. Лондоном определение содержимого кишечника — «химуса как смеси пищевых частиц и пищеварительных соков» — в целом существует до настоящего времени и не описывает механизмы фермент-субстратных взаимодействий в полости желудка и кишечника. Однако ещё в 40–60-х гг. XX века И.П. Разенковым, А.Д. Синещевым, Г.К. Шлыгиным была обнаружена экскре-

ция в полость значительных количеств эндогенных нутриентов, установлено формирование химуса относительно постоянного состава, в котором уровень всех ингредиентов существенно отличается от их содержания в рационе и приближается к концентрации в крови. В то же время выявлена рециркуляция различных нутриентов между кишечной полостью и внутренней средой организма.

Детальное изучение химуса в лабораториях Ю.М. Гальперина и А.А. Алиева позволило выделить рыхлые флокулярные структуры эндогенного происхождения, не идентифицирующиеся с экзогенными компонентами химуса, и предложить схему корпускулярного и инфлюдного пищеварения в полости кишечника [1]. Экспериментальные исследования сотрудников кафедры физиологии и биохимии животных МСХА им. К.А. Тимирязева на животных разных видов, основанные на различных концепциях об обменной функции пищеварительного тракта, впервые количественно охарактеризовали структурную организацию содержимого пищеварительного тракта. Разделив химус разных отделов ЖКТ на экзогенные и эндогенные структуры, сотрудники кафедры выявили закономерности изменения физико-химических свойств химуса по мере прохождения по пищеварительному каналу в связи с функциональной особенностью каждого отдела желудочно-кишечного тракта. Было установлено, что эндогенные структуры, образуя в химусе флокулы геля плотной эндогенной

фракции и являясь главным структурирующим звеном, выполняют функцию поддержания гомеостаза не только в энтеральной среде, но и во внутренней среде организма.

Цель работы — определение роли пищеварительной системы и эндогенных структур химуса в локализации и активации ферментов [2, 3].

Материалы и методы

Опыт проведён на мини-пигах светлогорской популяции, полученных в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, в возрасте 1,5 года (4 особи), и кроликах, полученных на кафедре физиологии и биохимии животных РГАУ — МСХА имени К.А. Тимирязева (4 особи), самцах, с соблюдением биоэтических норм, на здоровых животных, содержащихся в условиях вивария, соответствующих зоогигиеническим и зоотехническим требованиям. Основным принципом проведения всех экспериментов явился подбор таких методов исследования процессов пищеварения и всасывания, которые отражали бы их естественное проявление. У животных под общим наркозом отбирали кровь из аорты (*a. abdominalis*) и венозную кровь из желудочной вены (*v. gastrica sinistra*), дуоденальной (*v. duodenalis*), брыжеечной (*v. jejunalis*), вены слепой (*v. colica decstra*) и ободочной кишки (*v. coecalis*).

В острых опытах у всех животных извлекали пищеварительный тракт. Из желудка и всех отделов кишечника отбирали химус. По методике, разработанной Е.П. Поля-

ковой, химус разделяли на фракции: растворимую (РФ), плотную эндогенную (ПЭФ), пищевые частицы (ПЧ) [4].

После извлечения ЖКТ кишечник разделяли на двенадцатиперстную, тощую, подвздошную, слепую, ободочную и прямую кишки. Стенку кишечника разделяли на слизистую оболочку (СО) и серозно-мышечную оболочку (СМО) и слой слизистых наложений (СН) по методике, предложенной Б.В. Питраном [5].

Во фракциях химуса, слоях стенки пищеварительного тракта и в крови, притекающей к пищеварительному тракту и отекающей от его разных отделов, определяли биохимические показатели на универсальном биохимическом анализаторе Labio 200 («Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.», Китай) с использованием стандартных наборов «Витал Диагностика» (Россия): содержание общего белка, активность общей и панкреатической амилазы, щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ).

Результаты исследований

В эксперименте на кроликах выявлены изменения биохимических показателей крови после прохождения через стенку ЖКТ (табл. 1). Артериовенозная разница на уровне пищеварительного тракта кроликов свидетельствует об увеличении количества общего белка в крови, отекающей от желудка и тонкого кишечника, на 4–6% по сравнению с притекающей. Также заметно изменяет-

Таблица 1. Биохимические показатели крови кроликов

Table 1. Biochemical parameters of rabbit blood

Образец крови	Общий белок, г/л	ЛДГ, ед./л	Амилаза, ед./л	ЩФ, ед./л
Притекающая к ЖКТ	54,0±3,80	131,5±8,25	1520±222,0	46,5±10,3
Оттекающая от желудка	56,3±1,05	123,0±0,25	1110±32,7	250,0±59,7
Оттекающая от двенадцатиперстной кишки	57,3±1,58	106,8±8,30	1444±431,0	149,9±87,9
Оттекающая от тощей кишки	56,4±3,00	62,6±9,30	1346±293,8	156,0±65,5
Оттекающая от ободочной кишки	53,0±0,50	121,9±10,00	1316±311,3	141,9±35,4

Таблица 2. Биохимические показатели крови мини-пигов
Table 2. Biochemical blood parameters of mini pigs

Образец крови	ЛДГ, ед./л	Амилаза общая, ед./л	Амилаза панкреатическая, ед./л	ЩФ, ед./л	ГГТ, ед./л
Притекающая к ЖКТ	660,6±53,4	1671±395	1771±423	166,0±25,7	49,8±2,5
Оттекающая от желудка	696,2±137,0	1699±355	1804±403	173,3±28,2	63,9±9,5
Оттекающая от двенадцатиперстной кишки	659,6±42,3	1813±364	2012±423	171,0±27,3	57,0±5,9
Оттекающая от тощей кишки	732,8±65,1	1742±423	1933±542	172,3±20,9	62,9±1,1
Оттекающая от слепой кишки	683,8±11,6	2328±0,9	2450±0,8	144,0±0,0	56,0±0,9
Оттекающая от ободочной кишки	674,4±82,1	1659±382	1823±425	150,0±37,9	54,5±7,5

ся активность ферментов крови на уровне ЖКТ. Активность общей лактагдегидрогеназы снижается на 7–9% в крови, оттекающей от желудка и толстого отделов кишечника, и на 53% — от тонкого кишечника, в сравнении с притекающей кровью. Аналогичная закономерность отмечается и по амилазе, активность которой снижается в оттекающей крови на уровне желудка на 27%, тонком и толстом отделах кишечника — на 12–14%. Таким образом, кровь, проходя через капиллярную сеть пищеварительного тракта у кроликов, дополнительно насыщается белком, но активность ЛДГ и амилазы снижается. В то же время активность ЩФ существенно увеличивается в 5,3 раза в крови, оттекающей от желудка, и в 3–3,4 раза в крови, оттекающей от тонкого и толстого кишечника, по сравнению с притекающей кровью.

Биохимический анализ крови мини-пигов показал, что при прохождении крови через ЖКТ изменяется активность ферментов крови, но картина при этом несколько иная (табл. 2). Активность ЛДГ увеличивается в крови, оттекающей от желудка, тощей и слепой кишки, на 5%, 10% и 3% соответственно, по сравнению с притекающей артериальной кровью. Также увеличивается активность общей и панкреатической амилазы в проксимальном отделе тонкой кишки — на 8 и 13%. Особенно заметно увеличение активности панкреатической амилазы в крови, оттекающей

от слепой кишки, — на 39%. В отличие от кроликов, активность ЩФ незначительно увеличивается (на 3–4%) в крови, оттекающей от желудка, начала и середины тонкой кишки, и снижается на 10–13% в толстом кишечнике, в сравнении с её активностью в артериальной крови. Обращает внимание увеличение активности ГГТ в крови, оттекающей от желудка, тонкого и толстого кишечника, — на 28%, 26% и 9–12% соответственно.

Результаты исследований локализации ГГТ в стенке пищеварительного тракта показали, что её активность проявляется в СО во всех отделах тонкого кишечника (рис. 1). При этом самая высокая активность фермента обнаружена в СО проксимального отдела двенадцатиперстной кишки (6,077 ед./мг белка), но уже в её конце активность ГГТ резко снижается до 0,853 ед./мг белка. В СО проксимального отдела тощей кишки этот показатель постепенно повышается, достигая максимума в дистальном отделе (4,057 ед./мг белка). В проксимальном отделе СО подвздошной кишки активность ГГТ плавно снижается, достигая минимума в дистальном отделе.

В ходе исследований была установлена активность ГГТ в химусе. Причём активность фермента существенно различалась во фракциях химуса и сильно отличалась от активности в слизистой оболочке, при идентичной динамике. Так, активность



Рис. 1. Активность ГТТ в слизистой оболочке кишечника (ед./мг белка).
Fig. 1. GGT activity in the intestinal mucosa (U/mg protein).

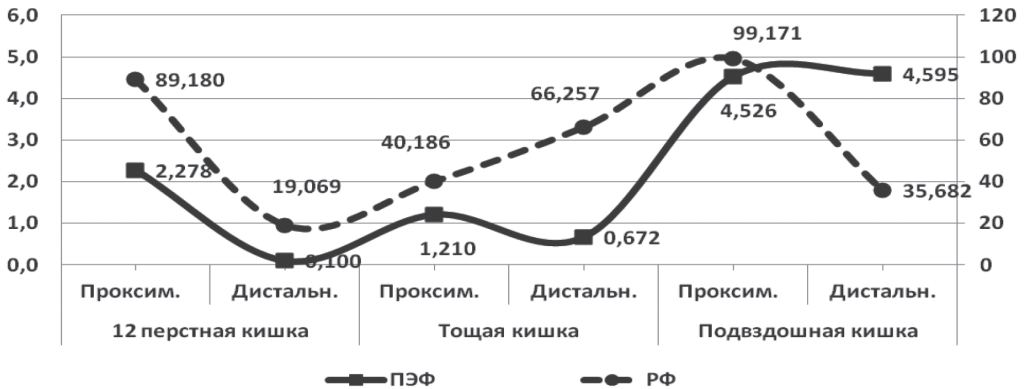


Рис. 2. Активность ГТТ во фракциях химуса (ед./мг белка).
Fig. 2. GGT activity in chyme fractions (U/mg of protein).

ГТТ в ПЭФ химуса (рис. 2) была существенно ниже, чем в СО: в проксимальной части химуса двенадцатиперстной кишки — в 2,5 раза, в дистальном отделе, как и в СО двенадцатиперстной кишки, показатель резко снизился, достигнув минимума (0,100 ед./мг белка), что в 8,5 раза ниже, чем в СО этого отдела. По мере движения химуса по тощей кишке активность ГТТ в ПЭФ возрастала до 1,210–0,672 ед./мг белка и была выше, чем в СО, в 2,1 раза в проксимальном отделе, и в 6,5 раза — в дистальном. Только в ПЭФ химуса подвздошной кишки активность ГТТ была выше в 1,5–2 раза, чем в слизистой оболочке этого отдела.

Самая максимальная активность ГТТ была зафиксирована в РФ химуса. В проксимальном отделе двенадцатиперстной кишки активность ГТТ была в 15 раз выше, чем в СО. В дистальном отделе активность ГТТ достигла 19,06 ед./мг белка, что в 22 раза выше, чем в СО. Активность фермента в РФ тощей кишки была в 13–15 раз выше, чем в СО. Самая высокая активность ГТТ была в РФ подвздошной кишки: в проксимальном отделе — 99,17 ед./мг белка, дистальном — 35,68 ед./мг белка, что в 25–35 раз выше, чем в СО. Таким образом, фермент ГТТ присутствует как в СО, что вполне объяснимо, так и в химусе, что обнаружено впервые. Причём чётко выраженная дина-

мика активности ГТТ в химусе, аналогичная динамике в СО, свидетельствует о физиологической взаимосвязи и необходимости этого явления.

Обсуждение результатов

Анализ результатов, полученных в экспериментах на кроликах и мини-пигах, показывает, что после прохождения через ткани стенки ЖКТ содержание органических компонентов крови и активность ферментов может значительно изменяться. Это происходит благодаря не только абсорбции нутриентов, но и в результате биосинтеза плазменных белков, активации либо дезактивации энзимов. Такие пищеварительные ферменты как амилаза и щелочная фосфатаза, проявляя свою функциональную активность в пищеварительной полости, также присутствуют в крови, оттекающей от ЖКТ. Отличительные особенности динамики их активности в оттекающей крови у кроликов и мини-пиггов, вероятно, связаны с видовыми морфофизиологическими особенностями пищеварительного тракта и разницей в рационах животных. В то же

время изменение активности не только пищеварительных ферментов, но транспортных (ГТТ) и гидролитических (ЛДГ) в крови, оттекающей от пищеварительного тракта, по сравнению с притекающей может служить диагностическим показателем работы ЖКТ.

Анализ распределения ГТТ позволяет утверждать, что гидролитические и транспортные ферменты, а также другие биологически активные вещества не хаотически распределяются в химусе, а имеют свои места локализации на структурах плотной эндогенной фракции, которая обеспечивает поверхностный контакт субстрата с гидролитическими ферментами. Составляя большую часть химуса тонкого отдела кишки, плотная эндогенная фракция неминуемо вступает в контакт со слизистыми наложениями. При этом образуется структурированная система транспорта между полостью кишечника и щёточной каймой слизистой оболочки кишечника, обеспечивающая направленное и регулируемое движение нутриента к энтероцитам через систему гликокаликса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Gal'perin I.M., Lazarev P.I., Kostiuhenko L.N., Vladimirova E.S. The practical aspects of research on heterophasic cavity digestion. *Usp. Fiziol. Nauk.* 1990;21(3):117–124.
2. Ivanov A.A., Poliakova E.P., Ksenofontov D.A. Experimental study of the structuring role and other chyme characteristics in some functionality gastrointestinal tract at enteral nutrition. *Eksp. Klin. Gastroenterol.* 2009;6:51–56.
3. Ivanov A.A., Poliakova E.P., Ksenofontov D.A., Ksenofontova A.A. Experimental substantiation of the functional relationship of mineral elements of nutrition with intestinal mucus and the mucosa membrane of the intestine. *Eksp. Klin. Gastroenterol.* 2013;2:37–41.
4. Ivanov A.A., Poliakova E.P., Ksenofontov D.A. General biological phenomenon of cation deposit by chyme structures and its implications for creation of enteral nutrition mixtures. *Eksp. Klin. Gastroenterol.* 2012;2:71–75.
5. Питран Б.В. Сорбционные процессы на начальных этапах всасывания в тонкой кишке. В кн.: *Мембранное пищеварение и всасывание*. Рига, 1986:107–109. [Pitran B.V. Sorbcionnye processy na nachal'nyh etapah vsasyvaniya v tonkoj kishke [Sorbtion processes at the initial stages of absorption in the small intestine]. V kn.: *Membrannoe pishchevarenie i vsasyvanie* [In the book: *Membrane digestion and absorption*]. Riga, 1986:107–109. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ксенофонтов Дмитрий Анатольевич*, д.б.н., доц., ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева»;

e-mail: smu@rgau-msha.ru

Dmitriy A. Ksenofontov*, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy;

e-mail: smu@rgau-msha.ru

Ксенофонтова Анжелика Александровна, к.б.н., доц., ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева»;

e-mail: angel-ksen@mail.ru

Anzhelika A. Ksenofontova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy;

e-mail: angel-ksen@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ДИНАМИКА СТАБИЛЬНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *SDHA*, *HPRT*, *PRL3D1* И *HES1* В РАМКАХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ КРЫС

Е.И. Лебедева¹*, А.С. Бабенко², А.Т. Щастный¹

¹ Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»
210009, Республика Беларусь, Витебск, просп. Фрунзе, 27

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»
220116, Республика Беларусь, Минск, просп. Дзержинского, 83

До настоящего времени не удалось выявить универсального набора референсных генов для нормализации данных полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Многочисленные исследования, затрагивающие выбор референсных генов для конкретных целей, далеко не всегда тщательно прорабатывают стратегию выбора. В ряде работ этап выбора референсных генов в принципе не используется ввиду дороговизны и иных причин. В результате этого для нормализации данных часто используются гены, неплохо зарекомендовавшие себя в иных, часто отличающихся, обстоятельствах эксперимента. Цель настоящего исследования заключалась в изучении динамики уровня мРНК генов в рамках моделирования фиброза печени крыс тиаоацетамидом.

При рассмотрении процесса фиброгенеза в целом, от интактной печени до развитого в ней фиброза, оптимальными референсными генами являются *hes1* и *sdha*. Однако при акцентах на конкретных этапах фиброза стоит выбирать пару генов в зависимости от показателей стабильности. На начальных стадиях фиброгенеза можно использовать *sdha* и *hprt*. Ген *hes1* наилучшим образом подойдёт на роль референсного в том случае, когда среднее значение Cq генов-мишеней будет составлять примерно 29 циклов (как у *hes1*). С осторожностью стоит использовать *hes1* при работе в диапазонах Cq генов-мишеней 26–29 и более 30, поскольку ошибка в таком случае будет нарастать. В отношении гена *sdha*, придерживаясь того же принципа, отметим как оптимум значение Cq, равное 27. В то же время допустима работа с диапазоном Cq 24–27, а в диапазонах выше 28 использование *sdha* может быть сопряжено с повышением ошибок расчётов.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, нормализация данных, референсный ген

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование работы: работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки — медицине» Министерства Здравоохранения Республики Беларусь, задание 2.89 «Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при её токсическом поражении» (регистрационный номер 20190107 от 19.02.2019).

Для цитирования: Лебедева Е.И., Бабенко А.С., Щастный А.Т. Динамика стабильности экспрессии генов *sdha*, *hprt*, *prl3d1* и *hes1* в рамках моделирования фиброза печени крыс. *Биомедицина*. 2022;18(2):17–30. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-17-30>

Поступила 28.03.2022

Принята после доработки 25.04.2022

Опубликована 10.06.2022

STABILITY OF THE *SDHA*, *HPRT*, *PRL3D1*, AND *HES1* GENE EXPRESSION IN A RAT LIVER FIBROSIS MODEL

Elena I. Lebedeva^{1*}, Andrei S. Babenko², Anatoly T. Shchastny¹

¹ Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University,
210009, Republic of Belarus, Vitebsk, Frunze Ave., 27

² Belarussian State Medical University,
220116, Republic of Belarus, Minsk, Dzerzhinsky Ave., 83, build. 15

So far, no versatile set of reference genes for normalizing real-time polymerase chain reaction data has been identified. Numerous studies focusing the selection of reference genes for specific purposes frequently fail to elaborate a suitable selection strategy. In a number of such studies, the stage of selecting reference genes is ignored due to either its high cost or other reasons. As a result, the normalization of data is carried out using genes, which have previously shown their effectiveness under other, sometimes completely different, experimental conditions. In this work, we aim to study variations in the level of mRNA expression of several genes, some of which are commonly used to normalize RT-PCR data. As special conditions, modeling of rat liver fibrosis with thioacetamide was used.

In our experiment, when considering the process of fibrogenesis as a whole, the optimal reference genes were found to be *hes1* and *sdha*. However, when focusing on specific stages of fibrosis, a pair of genes should be selected depending on the stability indicators. At the initial fibrogenesis stages, *sdha* and *hpert* can be used. The *hes1* gene is suitable as a reference gene, when the average Cq value of the target genes is approximately 29 cycles (as in *hes1*). *Hes1* should be used with care when working in the Cq ranges of target genes of 26–29 and above 30, since the error is likely to increase. Following the same principle, the optimum Cq value for the *sdha* gene was observed to be 27, although the Cq range of 24–27 is also acceptable. At the same time, when working in the Cq range of above 28, the use of *sdha* may be associated with an increase in calculation errors.

Keywords: real-time PCR, qPCR, data normalization, reference gene, gene expression

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

Funding: the work was carried out within the framework of the state research program “Fundamental and Applied Sciences for Medicine” of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, assignment No. 2.89 “To study the role of the expression of NOTCH- and TWEAK-signaling pathway genes involved in the processes of proliferation and differentiation of liver cells in normal and under its toxic damage” (registration No. 20190107 dated February 19, 2019).

For citation: Lebedeva E.I., Babenko A.S., Shchastny A.T. Stability of the *sdha*, *hpert*, *prl3d1*, and *hes1* Gene Expression in a Rat Liver Fibrosis Model. *Journal Biomed.* 2022;18(2):17–30. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-17-30>

Submitted 28.03.2022

Revised 25.04.2022

Published 10.06.2022

Введение

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ) является быстрым, высокоточным, чувствительным и воспроизводимым методом оценки уровня мРНК в клетках. В ряде случаев ПЦР-РВ может быть предпочтительнее высокопроизводительного секвенирования при оценке

относительного уровня экспрессии генов как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. Для реализации всех преимуществ ПЦР-РВ необходимо уделять максимальное внимание вопросам стандартизации и воспроизводимости результатов. Специалисты, как правило, выделяют несколько ключевых этапов получения адек-

ватных, воспроизводимых и точных данных. Во-первых, это выделение чистых и сохранивших в значительной степени свою целостность препаратов общей фракции РНК. Во-вторых, корректный выбор стратегии нормализации количественных данных ПЦР-РВ, включая обоснованный выбор референсных генов или их групп, и пр. Вопрос стандартизации и воспроизводимости данных остро стоит при использовании любых методов анализа, однако во многих случаях существуют подробные и проверенные руководства, направленные на минимизацию систематических и случайных ошибок. В случае ПЦР-РВ роль такого руководства выполняет MIQE Guidelines (Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments). Этот, разработанный в 2009 г. ведущими специалистами в области ПЦР-РВ, сборник накопленных экспериментальных данных по вопросу нормализации и стандартизации количественных данных ПЦР нашёл широкое применение среди исследователей лабораторий самого разного профиля [4, 17, 21].

Публикация MIQE не решила проблему стандартизации данных ПЦР полностью. К сожалению, далеко не все лаборатории могут себе позволить точно следовать пунктам руководства по целому ряду причин: стоимость исследований, оснащение необходимыми материалами и оборудованием, несогласие с некоторыми тезисами и пунктами руководства и пр. Таким образом, несмотря на более чем 10-летний период существования руководства MIQE, в современной литературе по-прежнему появляются работы, полностью или частично противоречащие друг другу. Как показывает практика, вне зависимости от точного соблюдения всех требований MIQE, при оценке уровня экспрессии генов очень большую роль играет выбор правильной стратегии нормализации данных и, в частности, выбор адекватных референсных генов. Этой проблеме посвящено достаточно

большое количество работ. Практически во всех случаях авторы предлагают использовать для выбора оптимальных референсных генов специализированные алгоритмы, например BestKeeper (qBase), NormFinder, geNorm, и достаточно стандартную панель из числа генов домашнего хозяйства. Некоторые авторы указывают на невозможность введения единого критерия нормализации для различных тканей и экспериментальных условий. Само собой, это создаёт преграды унификации и стандартизации подходов к нормализации, требует выбора различных генов и их сочетания в экспериментах на разных тканях и в зависимости от условий эксперимента [1, 3, 7, 13, 16].

Цель настоящего исследования заключается в изучении динамики уровня мРНК генов в рамках длительного экспериментального воздействия химическим агентом (тиоацетамид). Выбранные мишени (*sdha*, *hprt*, *prl3d1* и *hes1*) рассматриваются нами с точки зрения возможности использования их в качестве референсных генов для нормализации данных ПЦР-РВ. В качестве модельного процесса выбран фиброгенез печени с последующим переходом в цирроз. Модельный организм — крысы Wistar.

Материалы и методы

В качестве генов-мишеней использовали два часто встречающихся в литературных источниках референсных гена (нормализация данных ПЦР-РВ) — *sdha* (NCBI Gene ID: 157074) и *hprt1* (NCBI Gene ID: 24465). Кроме этого, использовали два гена, выступавших только в качестве целевых объектов (генов-мишеней) в экспериментальных исследованиях и никогда не используемых в качестве референсных — *prl3d1* (NCBI Gene ID: 53950) и *hes1* (NCBI Gene ID: 29577).

Ген *sdha* кодирует субъединицу А сукцинатдегидрогеназы, экспрессируется в большинстве тканей, вовлекается в процесс

обмена веществ. Участвует в переносе электронов с сукцината на кофермент Q в рамках электрон-транспортной цепи митохондрий [14].

Ген *hprt1* кодирует фермент гипоксантин фосфорибозил трансферазу, который превращает гуанин в гуанозинмонофосфат, а гипоксантин — в инозинмонофосфат. Один из ключевых белков обмена пуриновых нуклеотидов. В значительном количестве обнаруживается различных тканях [18].

Ген *prl3d1* не относится к обычным белкам взрослого организма крыс и является членом крупного семейства пролактина. Большие количества этого белка встречаются во второй половине срока беременности самок крыс. В норме у взрослых особей практически не встречается. Этот белок связывается с рецепторами пролактина. Участвует в регуляции ответа на поступление питательных веществ; стимуляции сигнального пути JAK-STAT; регуляции деления клеток; контроле над репродуктивной функцией, включая собственно беременность и лактацию [9].

Ген *hes1* относится к семейству Hes — внутриядерных белков клетки, регулирующих транскрипцию. Является ингибитором транскрипции для белков, которые используют в этом процессе белок bHLH. Вовлекается в ряд физиологически важных процессов, таких как репарация ДНК, митогенез, клеточная адгезия и миграция и пр. [12].

Дизайн эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными Учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, от 18.03.1986, Директивой Совета ЕЭС от 24.11.1986

и рекомендациями FELASA Working Group Report (1994–1996).

В эксперименте использовали половозрелых крыс-самцов Wistar (72 особи начальной массой 190–210 г). Животные прошли карантинный режим вивария и не имели внешних признаков каких-либо заболеваний. Крысы содержались в пластиково-металлических клетках (по 6 особей), размещённых на стеллажах при естественном освещении, со свободным доступом к корму и воде. В качестве подстилки использовали предварительно обеззараженные опилки. Температура в помещении вивария поддерживалась на уровне 21–23°C, а влажность воздуха составляла 50%. Все животные получали стандартный, сбалансированный рацион питания в установленное время. В качестве питья крысы получали питьевую воду.

Фиброгенез печени у животных индуцировали раствором тиоацетамида (ТАА), который вводили в желудок с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы тела животного два раза в неделю за 3 ч до кормления в течение 11 недель. С использованием генератора случайных чисел животных рандомизировали на 6 групп по 12 особей в каждой (m0 — контрольная, m1 — длительность воздействия ТАА 3 недели, m2 — длительность воздействия ТАА 5 недель, m3 — длительность воздействия ТАА 7 недель, m4 — длительность воздействия ТАА 9 недель, m5 — длительность воздействия ТАА 11 недель. Крысы контрольной группы получали аналогичный объём воды без ТАА.

Крыс выводили из эксперимента декапитацией с применением гильотины в состоянии кратковременного эфирного наркоза: опытных — через 3, 5, 7, 9 и 11 недель, а интактных — по окончании эксперимента.

Для изучения уровня экспрессии мРНК генов методом ПЦР-РВ скальпелем из большой левой доли печени крыс забирали фрагмент органа диаметром не более 5 мм.

После забора образцы помещали в криопробирки и далее в жидкий азот для транспортировки и хранения непосредственно до начала процедуры выделения РНК.

Выделение суммарной РНК проводили с помощью набора реагентов «АртРНК MiniSpin» (ООО «АртБиоТех», Беларусь) согласно протоколу производителя. Гомогенизацию образцов проводили с использованием фарфоровых ступок и пестиков в присутствии жидкого азота, не допуская размораживания образцов.

После процедуры выделения и очистки суммарную РНК сбивали с мини-колонок с помощью свободной от РНКаз milliQ воды, входящей в состав набора. Контроль качественных характеристик образцов проводили с помощью электрофореза в агарозном геле (выборочно) без денатурирующих условий (1x TAE, 2% гель). Количество суммарной РНК после выделения определяли с помощью спектрофотометрии (длина волны — 260 нм, Quantus, Promega, США). Выборочно снимали спектр поглощения 220–340 нм.

Синтез кДНК проводили с использованием олиго-дТ-праймеров и набора реагентов ArtMMLV Total (ООО «АртБиоТех», Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя. Для одной реакции использовали одинаковое стартовое количество суммарной РНК 200 нг/реакцию.

Для дизайна специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов использовали данные о последовательностях мРНК генов, депонированные в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). В случае наличия нескольких вариантов мРНК перед началом дизайна проводили их выравнивание с помощью бесплатного программного пакета Ugene v.33 («UniPro», Россия). Для дизайна использовали консервативные участки последовательности мРНК с соблюдением правила о размещении одного или более олигонуклеотидов в месте соединения двух разных экзонов.

Первичный дизайн проводили с помощью бесплатного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Уни-кальность и специфичность полученных олигонуклеотидов проверяли с помощью онлайн-сервиса Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализ наличия стабильных димеров и шпилечных структур олигонуклеотидов и ампликонов, а также моделирование оптимальных условий ПЦР-РВ осуществляли с помощью бесплатного онлайн программного пакета mFold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) и бесплатного онлайн-приложения OligoAnalyser (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Последовательности олигонуклеотидов представлены в табл. 1.

Для проведения ПЦР-РВ использовали реагенты производства ОДО «Праймтех» (Беларусь). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал все необходимые компоненты в следующих концентрациях: 2 мМ хлорида магния, 0,1 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, 500 нМ олигонуклеотидов, включая зонд для ПЦР-РВ, 1,25 ед. термостабильной Taq ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором.

Режим термоциклирования: +95°C — 2 мин, затем 40 циклов: +95°C — 5 с, +60°C — 45 с. Детекция по каналу FAM после каждого цикла. В работе использовали оборудование производства компании «BioRad» (прибор «CFX96touch», США). Критерием успешной оптимизации считали наименьший показатель цикла амплификации. Эффективность реакций определяли с помощью метода стандартной кривой и серий разведений концентрированных образцов кДНК. Шаг — 5 раз. Критерием удовлетворительной эффективности считали не менее 90%. Для определения уровня экспрессии генов проводили ПЦР-РВ согласно оптимизированным протоколам для всех мишеней. Все реакции проводили

Таблица 1. Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов
Table 1. Sequences of specific oligonucleotide primers and fluorescently labeled probes

Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Метка, 5'	Метка, 3'
<i>hprtF</i>	GGACAGGACTGAAAGACTTGCT		
<i>hprtR</i>	ACAGAGGGCCACAATGTGAT		
<i>hprtP</i>	CATGAAGGAGATGGGAGGCC	FAM	BHQ1
<i>priF</i>	CCTTATACAACAGGACTCAGGCTA		
<i>priR</i>	ACTGCAAGTCTTTGAGTCCAGA		
<i>priP</i>	GAAAATTTTGACTACCTGCCTGG	FAM	BHQ1
<i>sdhaF</i>	CCCACAGGTATCTATGGTGCT		
<i>sdhaR</i>	TTGGCTGTTGATGAGAATGC		
<i>sdhaP</i>	CATCACAGAAGGGTGCCGTG	FAM	BHQ1
<i>hes1F</i>	GAAAGATAGCTCCCGGCATT		
<i>hes1R</i>	CGGAGGTGCTTCACTGTCAT		
<i>hes1P</i>	CCAAGCTGGAGAAGGCAGACA	FAM	BHQ1

в триплетах. В каждой группе все 12 образцов анализировали отдельно для получения наибольшей достоверности и учёта внутригрупповой вариации, фенотипической гетерогенности уровня экспрессии генов.

Стабильность уровня мРНК генов оценивали с использованием показателя стандартного отклонения, а также алгоритмов BestKeeper, NormFinder и geNorm в рамках бесплатного онлайн-приложения RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>) [8, 15].

Для проведения гистологического исследования образцы печени крыс помещали в 10%-ный р-р нейтрального формалина на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 ч. Затем проводили обработку фиксированного материала с последующей заливкой в парафин с использованием автомата для гистологической обработки ткани Thermo STP-120 («Thermo Fisher Scientific», Германия) и станции для заливки ткани парафином Thermofisher EC350 («Thermo Fisher Scientific», Германия). От каждого животного получали по одному блоку и с помощью микротомы Thermo M340E (MICROM, «Laborgerate GmbH», Германия) изготавливали в среднем по 3–4 среза толщиной 4 мкм и помещали их на предметные стёкла.

Для выявления соединительной ткани применяли окраску по методу Маллори в автоматическом стейнере «Thermo HMS70» («Thermo Fisher Scientific», Германия).

Результаты количественных измерений оценивали с использованием программ Statistica 10.0 («StatSoft Inc.» США), IBM SPSS Statistics 23.0, Microsoft Office Excel («Microsoft Corp.», США).

Результаты исследований

Данные ПЦР-РВ были получены для 216-ти образцов кДНК. Согласно плану исследования, все образцы разделили на 6 групп в соответствии с временем воздействия химическим фактором (m0 — интактные образцы, без воздействия, m1– m5 — экспериментальные образцы после воздействия тиацетамидом). Каждая группа образцов состояла из 12-ти кДНК, полученных в триплетах, суммарно — 36.

Для всех генов на всех экспериментальных и контрольных точках определили показатели диапазона Cq (quantitation cycle), а также выделили в отдельный столбец число циклов, составляющее эти диапазоны. Данные представлены в табл. 2.

Данные о диапазонах Cq на разных этапах исследования различаются, что, по-

Таблица 2. Динамика изменений диапазона значений *Cq* исследуемых генов на разных контрольных точках эксперимента

Table 2. Dynamics of the *Cq* ranges for the studied genes at different control points of the experiment

Точка	*Диапазон <i>Cq</i>				**Число циклов			
	<i>hprt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>	<i>hprt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>
m0	24,4–29,0	25,0–28,9	34,4–39,0	26,8–31,1	4,6	3,9	4,6	4,3
m1	24,5–27,4	24,6–27,3	33,8–36,9	28,1–29,8	2,9	2,7	3,1	1,7
m2	27,6–30,7	27,0–30,3	32,7–37,1	28,3–31,8	3,1	3,3	4,4	3,5
m3	26,9–29,8	26,2–28,6	32,5–37,7	28,3–30,2	2,9	2,4	5,3	1,9
m4	26,7–29,7	26,9–28,4	30,9–35,2	28,5–30,1	3,0	1,6	4,3	1,6
m5	27,7–29,2	26,4–28,8	32,3–35,9	27,9–29,9	1,6	2,4	3,6	2,0
Все	24,4–30,7	24,6–30,3	30,9–39,0	26,8–31,1	6,3	5,7	8,1	4,3

Примечание: * — минимальное и максимальное значение *Cq* (quantitation cycle) для всех образцов данной точки эксперимента, $n=36$ (12 образцов в триплетах); общее количество образцов в графе «все» — 216; ** — разница между максимальным и минимальным значением цикла (*Cq*).

Note: * — minimum and maximum *Cq* value (quantification cycle) for all samples at this point of the experiment, $n=36$ (12 samples in triplets); total number of samples in the column “all” = 216; ** — difference between the maximum and minimum values of the cycle (*Cq*).

видимому, указывает на то, что все гены так или иначе реагируют на экспериментальные условия. Этого, безусловно, следует избегать в случае использования гена в качестве референсного для нормализации данных ПЦР-РВ. Даже допущение того, что разница в 2 цикла является следствием ошибки эксперимента, связанной с ручным способом постановки ПЦР-РВ, в подавляющем большинстве случаев она выше.

Для гена *prl3d1* диапазоны *Cq* являются чрезвычайно высокими (*Cq* выше 30-го цикла, среднее — 34,9 цикла), что, в свою очередь, говорит о низком уровне мРНК этого гена. Вследствие этого повышается вероятность и значимость ошибок пипетирования при работе. Снижается ценность *prl3d1* в качестве потенциального референсного гена для нормализации данных ПЦР-РВ. Также становится сложнее определить реальные колебания уровня мРНК в ответ на экспериментальное воздействие. Стоит отметить и колебания уровня мРНК гена *prl3d1* в ходе эксперимента в разных группах практически на порядок (3–3,3 цикла).

Следующий включённый в исследование, нетипичный для референсного, ген *hes1* также не отличался высокой стабильно-

стью и показывал различный разброс *Cq* в экспериментальных группах и контроле (m0). Тем не менее, в большинстве групп диапазон его *Cq* на превышал 2, что говорит в пользу более высокого потенциала этого гена для использования в качестве референсного. Уровень мРНК со средним значением *Cq* 29,3 допускает его использование при анализе экспрессии генов с показателем *Cq* в диапазоне 29–35. Этот ген не является идеальным референсным геном, однако в рамках данного эксперимента по моделированию фибротических изменений в печени крысы под действием химического индуцирующего фактора может быть рассмотрен как ген-кандидат, в отличие от *prl3d1*.

Анализ уровня мРНК часто используемых в качестве референсных генов *sdha1* и *hprt1* показал, что при умеренной экспрессии (в среднем *Cq* порядка 27-го цикла для обоих генов) наблюдается значительный разброс значений *Cq* от группы к группе (см. табл. 3, столбец «Среднее значение *Cq*»).

Как и в случае с *prl3d1*, разброс *Cq* генов *sdha1* и *hprt1* между группами практически во всех случаях превышал 2. Это негативным образом сказалось и на показателях стандартного отклонения *Cq* (табл. 3).

Таблица 3. Вариация средних значений и стандартных отклонений *Cq* исследуемых генов на разных контрольных точках эксперимента

Table 3. Variation of the *Cq* mean values and standard deviations at different control points of the experiment

Точка	Среднее значение <i>Cq</i>				Стандартное отклонение <i>Cq</i>			
	<i>hprt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>	<i>hprt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>
m0	27,1	26,8	36,5	29,5	1,2	0,9	1,1	0,9
m1	25,7	26,0	35,2	29,2	0,6	0,6	0,8	0,6
m2	28,8	28,2	34,9	29,5	0,7	0,9	1,2	1,0
m3	27,8	27,0	34,7	29,2	0,8	0,6	1,4	0,6
m4	27,9	27,5	34,2	29,5	0,6	0,4	0,7	1,0
m5	28,5	27,6	34,1	29,1	0,4	0,6	0,9	0,7
Все	27,6	27,2	34,9	29,3	1,3	1,0	1,3	0,8

Как видно из таблицы, на основании данных о стандартном отклонении *Cq* только *hes1* в среднем по эксперименту показал значение менее 1. Ген *sdha1* не превысил показателя 1. На основании этих данных, без применения специальных программных средств, можно считать, что пара *hes1* и *sdha1* может быть использована для нормализации данных ПЦР-РВ.

При более внимательном взгляде на изменение уровня мРНК генов (рис. 1) становится заметнее разница между эффектом ТАА в разных группах (m0–m5). Мы намеренно не провели нормализацию данных с использованием референсного гена, а лишь применили расчёт изменений уровня мРНК относительно точки m0.

Уровень мРНК гена *hes1* относительно стартовой точки (m0 — интактные животные) колебался в пределах погрешности эксперимента и во всех точках не отличался от стартового более чем в два раза. Примерно такие же результаты удалось получить и для гена *sdha*. Уровень его экспрессии в точке m2 изменился относительно стартового более чем в 2 раза (2,5 раза). Тем не менее, на протяжении всего последующего эксперимента он оставался в пределах ошибки. Неожиданным оказался скачок в 2,5 раза (m1) и последующее падение в 3 раза (m2, разница колебаний m1–m2 составила примерно 6 раз) уровня мРНК *hprt*. Несмотря на то, что далее в точках m3–m5 значения стабилизировались, однознач-

но признать *hprt* надёжным референсным геном в рамках настоящего эксперимента нельзя. Наконец, касательно *prl3d1* прослеживается чёткий ответ на воздействие ТАА на протяжении всего эксперимента.

Параллельно оценке уровня мРНК для всех образцов печени на всех контрольных точках проводили морфологическое исследование (данные не представлены), что позволило сопоставить этапы развития фиброза и сравнить точки m1–m5 с интактной печенью m0. Согласно шкале балльной оценки степени фиброза печени по шкале Ishak K.G. [6], все контрольные точки эксперимента были охарактеризованы в связи с баллами F шкалы (табл. 4).

Согласно данным диаграмм, представленным на рис. 1, в точке m1 уровень мРНК всех 4-х исследуемых генов отреагировал на введение тиацетамида. В точке m1 при начальных изменениях тканей печени уровень мРНК всех генов возрос. Тем не менее, *hes1* и *sdha* не показали заметного роста или падения в дальнейшем. В то время как *hprt* серьёзно отреагировал не только в точке m1, но и далее сильным падением в точке m2 в рамках прогрессирования фиброза. В свою очередь, повышение уровня мРНК гена *prl3d1* может рассматриваться как маркер усугубления степени фиброза от F1 до F5 по шкале, вплоть до стадии перехода фиброза в цирроз.

Использование программных алгоритмов анализа стабильности уровня мРНК

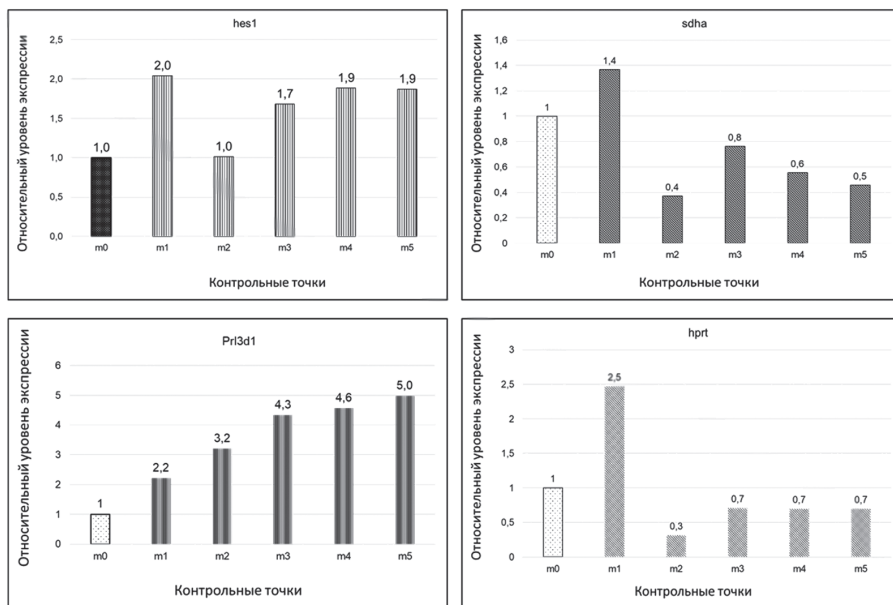


Рис. 1. Изменение относительного уровня экспрессии генов (относительно контрольной точки *m0*), на разных этапах фиброгенеза (контрольные точки *m1–m5*).

Fig. 1. Variations in the relative mRNA expression level (relative to the checkpoint *m0*), at different stages of fibrogenesis (checkpoints *m1–m5*).

исследуемых генов, с одной стороны, подтвердили описанные выше результаты, но с другой — привнесли некоторые новшества, заставляющие внимательно обдумать и взвесить окончательный выбор для нормализации данных ПЦР-РВ.

В табл. 5 представлены сравнительные данные анализа стабильности уровня мРНК генов-кандидатов.

Наименьший показатель стандартного отклонения *Sq* для всех образцов в сумме показал ген *hes1*. Геном-кандидатом, кото-

Таблица 4. Оценка степени фиброза печени экспериментальных животных
Table 4. Assessment of liver fibrosis stages in experimental animals

Группы животных	Балльная оценка степени фиброза печени по шкале Ishak K.G.	Гистологическая характеристика степени выраженности фиброза
m0	F0	Фиброз отсутствует
m1	F1	Фиброзное расширение порталных трактов с короткими фиброзными септами или без них
m2	F2/F3	Фиброзное расширение большинства порталных трактов с короткими фиброзными септами или без них. Единичные мостовидные порто-портальные септы
m3	F3/F4	Фиброзное расширение большинства порталных трактов с единичными мостовидными порто-портальными септами, местами с выраженными мостовидными порто-портальными и единичными порто-центрными септами
m4	F4/F5	Период трансформации фиброза в цирроз. Фиброзное расширение большинства порталных трактов с выраженными мостовидными порто-портальными и единичными порто-центрными септами. Диффузная нодулярная перестройка паренхимы (неполный цирроз)
m5	F5	

Таблица 5. Изменение стабильности референсных генов в зависимости от контрольной точки эксперимента (стадия фиброза) и выбранного алгоритма анализа стабильности
Table 5. Variation in the stability of reference genes depending on the control point of the experiment (fibrosis stage) and the selected stability analysis algorithm

Точка	Стандартное отклонение				BestKeeper				NormFinder			
	<i>hpvt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>	<i>hpvt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>	<i>hpvt</i>	<i>sdha</i>	<i>prl3d1</i>	<i>hes1</i>
m0	1,22	0,88	1,15	0,87	1,02	0,74	0,82	0,83	1,02	0,42	0,85	1,20
m1	0,59	0,60	0,77	0,62	0,46	0,62	0,61	0,54	0,54	0,64	0,65	0,71
m2	0,73	0,87	1,21	0,95	0,66	0,79	1,00	0,76	0,70	0,31	0,91	1,31
m3	0,81	0,57	1,36	0,65	0,69	0,58	1,03	0,53	0,69	0,73	1,18	0,87
m4	0,62	0,38	0,74	0,96	0,60	0,22	0,58	0,76	0,82	0,40	1,04	0,94
m5	0,38	0,63	0,87	0,65	0,22	0,52	0,74	0,57	0,44	0,45	0,57	0,81
Всего	1,28	0,98	1,28	0,81	1,06	0,80	1,31	0,83	1,16	0,59	1,50	0,94

рый способен составить пару *hes1* для расчёта среднего геометрического значения и повышения качества анализа, является *sdha*. Такой же результат был предоставлен и алгоритмами BestKeeper и NormFinder — пара *hes1/sdha*. Однако алгоритм geNorm счёл оптимальной парой референсных генов для модели индуцированного химическим фактором фиброза *hpvt/sdha*.

Обсуждение результатов

В рамках настоящего исследования оценивали уровень мРНК генов, которые используются в работах других авторов как в качестве референсных, для нормализации данных ПЦР в режиме реального времени (*sdha* и *hpvt1*), а также как собственно объекты исследований различных процессов — мишени (*prl3d1* и *hes1*). За более чем 20-летний опыт нормализации данных ПЦР-РВ, к сожалению, не удалось выявить универсального набора референсных генов. Тем не менее, в настоящее время существуют коммерчески доступные панели кандидатов в референсные гены, а также некий свод правил по их поиску и валидации в целом. Многочисленные работы, затрагивающие выбор референсных генов для конкретных целей, далеко не всегда тщательно прорабатывают стратегию выбора. Более того, во многих работах этап выбора референсных генов в принципе не используется ввиду дороговизны иссле-

дований и иных причин. В результате этого для нормализации данных ПЦР-РВ часто используются гены, неплохо зарекомендовавшие себя в иных, часто отличающихся, обстоятельствах эксперимента.

На примере нашего исследования мы показали, что при моделировании фиброза печени у крыс с помощью химического индуктора гены-кандидаты ведут себя нелинейно и порой непредсказуемо на разных этапах одного и того же процесса — фиброгенеза. Само собой, при работе в менее благоприятных условиях, без поддержки морфолога, порой очень сложно сформировать выборку образцов тканей печени так однородно, как это удалось нам. Тем более, если речь идёт о клинических случаях, работе с биоптатами печени.

На основании полученных нами результатов стоит отметить, что к вопросу выбора оптимальных референсных генов стоит подходить тщательно, посвящая этому процессу отдельное время и ресурсы до начала главного эксперимента. Так, если планируется изучение перехода фиброза в цирроз, то стоит отдать предпочтение популярному референсному гену *sdha*, а пару ему может составить *hpvt1*. В то же время на ранних этапах фибротических изменений, когда интактная печень только начинает подвергаться индуцирующему фиброз воздействию, стоит отдать предпочтение *hpvt*. И несмотря на то, что в паре с ним может идти

sdha, в интактной печени без воздействия оба этих гена использовать не рекомендуется, а на роль оптимального референсного гена выходит *hes1*.

Не стоит рассматривать на роль оптимального референсного гена *prl3d1* ввиду низкого уровня экспрессии, но даже при сопоставимом уровне предполагаемых мишеней нельзя забывать о том, что этот ген экспрессируется преимущественно во время беременности и лактации, и в принципе не стоит его принимать во внимание у взрослых самцов. В то же время в рамках некоторых патологических состояний уровень его экспрессии может изменяться и, наоборот, служить маркером, мишенью, а не референсом.

В отличие от *prl3d1*, ген *hes1* охотнее воспринимается как вероятный кандидат в референсные гены ввиду более высокого уровня экспрессии. Тем не менее, на основании полученных нами данных *hes1* показывал наилучшую стабильность экспрессии лишь в образцах интактной печени, а в ходе эксперимента по индукции фиброза реагировал на экспериментальные условия. Так же, как и в случае с *prl3d1*, ген *hes1* часто используется в качестве молекулярной мишени. Несмотря на это, в рамках нашей работы суммарно по всем контрольным точкам — от интактной ткани печени до перехода фиброза в цирроз — именно *hes1* оказался наиболее стабильно экспрессирующимся и в меньшей степени в среднем отвечал на экспериментальное воздействие индуктором фиброза.

В отличие от *prl3d1* и *hes1*, гены *sdha* и *hpvt* можно часто встретить в современной литературе в качестве референсных. При среднем уровне экспрессии данные гены достаточно стабильны в различных тканях лабораторных крыс как в интактном виде, так и во время воздействия экспериментальными химическими, физическими и биологическими факторами.

В похожей по дизайну работе [20] ещё в 2015 г. исследователи сравнили стабиль-

ность экспрессии 12 кандидатов в референсные гены. *Sdha* и *hpvt* оказались достаточно стабильными в ткани печени при воздействии химических токсических веществ. К сожалению, работа была проведена лишь на 4-х животных без продолжительного воздействия и моделирования конкретных патологических процессов, таких как фиброз или цирроз.

Годом позже группа учёных [11] изучила стабильность экспрессии гена *sdha* под воздействием гипергликемии, гипоксии и химического вещества изофлуран. В качестве модельного объекта использовали культуру клеток кардиомиобластов крысы — H9c2. В ходе комбинирования неблагоприятных факторов оказалось, что экспрессия *sdha* в среднем изменяется на 15% с минимальным ответом в 10% после 6 ч воздействия и максимальным в 40% и более после первых суток. Хотя вариация в 15% не является критической, всё же важно принимать во внимание время инкубации и дозу фактора.

Интересно отметить и работу [19], в которой учёные предлагают оптимизированную панель из 9-ти наиболее популярных генов-кандидатов в референсные. Разработанная панель направлена на облегчение поиска оптимальных референсных генов в различных тканях организма крысы. Среди генов, включённых панель, присутствуют *sdha* и *hpvt*.

В работах [2, 22] говорится о том, что гены *sdha* и *hpvt* не стоит использовать при работе с аноректальными пороками у крыс. По видимому, ассоциированные ткани имеют серьёзные отличия в уровне экспрессии этих генов. В исследование включили 18 животных, никаких дополнительных воздействий не осуществляли. Также группа M. Hlavackova, et al. [10] отметила, что гены *sdha* и *hpvt* в тканях сердечной мышцы у крыс при экспериментальной гипоксии не подходят на роль референсных из-за высокой вариабельности уровня мРНК. Работа проводилась на 12-ти животных. Сравнили

уровень мРНК генов-кандидатов до и после экспериментального воздействия.

В работе [5], как и в настоящем исследовании, индукцию фиброза проводили с использованием ТАА. Внушительный объём выборки: 60 особей, разделённых на 5 групп, отсутствие подготовки и обоснования выбора референсного гена. *Hprt* используется на всех этапах исследования.

Таким образом, мы видим, что часть исследований по оценке уровня мРНК генов в тканях крысы используют для нормализации данных ПЦР-РВ данные сторонних, порой сильно отличающихся, работ. Часть исследований проводит выбор референсных генов отдельно от основного эксперимента, и часто разные группы приводят противоречивые данные о стабильности экспрессии генов. Наконец, часть исследований с хорошей технической проработкой и подготовкой опытов всё же не учитывает различный эффект от воздействия экспериментальными условиями на разных этапах исследования.

Выводы

В различных источниках можно встретить понятные и известные, но вместе с тем не всеми применяемые правила нормализации данных ПЦР-РВ. Одним из наиболее важных считают использование стабильно экспрессирующегося от образца к образцу, не отвечающего на экспериментальное воздействие и имеющего сопоставимые с мишенью показатели уровня мРНК гена. При невозможности выбора одного, что часто и происходит в силу различных причин, рекомендуют использовать два и даже три референсных гена одновременно.

Опираясь на результаты нашего исследования, мы хотим добавить, что:

– при изучении каких-либо процессов (в условиях физиологической нормы

или патологических) в тканях млекопитающих стоит оценивать характеристики референсных генов на всех контрольных точках эксперимента и/или при возможно большем числе состояний (важно в клинической диагностике);

– обязательно проводить этап выбора референсных генов до начала основного эксперимента минимум на 10-ти образцах биологического материала, максимально близко соответствующего таковому в экспериментальной группе, причём мы рекомендуем проводить эту работу даже при полном повторении сторонних авторов;

– в зависимости от цели и задач эксперимента использовать наиболее стабильно экспрессирующиеся гены в среднем по опыту или для каждой контрольной точки в отдельности, если гены не совпадают.

Применительно к настоящему исследованию, при рассмотрении процесса фиброгенеза в целом от интактной печени до развитого в ней фиброза, оптимальными референсными генами являются *hes1* и *sdha*. Однако при акцентах на конкретных этапах фиброза стоит выбирать пару генов в зависимости от показателей стабильности. На начальных стадиях фиброгенеза можно использовать *sdha* и *hprt*. Ген *hes1* наилучшим образом подойдёт на роль референсного в том случае, когда среднее значение *Cq* генов-мишеней будет составлять примерно 29 циклов (как у *hes1*). С осторожностью стоит использовать *hes1* при работе в диапазонах *Cq* генов-мишеней 26–29 и более 30-ти, поскольку ошибка в таком случае будет нарастать. В отношении гена *sdha*, придерживаясь того же принципа, отметим как оптимум значение *Cq*, равное 27. В то же время допустима работа с диапазоном *Cq* 24–27, а в диапазонах выше 28-ти использование *sdha* может быть сопряжено с повышением ошибок расчётов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Biredinc A., Mehta R., Alhussain R., Afendi A., Chandhoke V., Younossi Z., Баранова А. Выбор надёжных контрольных генов для количественной ПЦР в реальном времени на образцах неопухоловой ткани желудка человека. *Молекулярная биология*. 2012;46(1):166–175. [Biredinc A., Mehta R., Alhussain R., Afendi A., Chandhoke V., Younossi Z., Baranova A. Vybór nadezhnyh kontrol'nyh genov dlya kolichestvennoj PCR v real'nom vremeni na obrazcah neopuholevoj tkani zheludka cheloveka [Selection of reliable control genes for quantitative real-time PCR on samples of non-tumor human gastric tissue]. *Molecular biology*. 2012;46(1):166–175. (In Russian)].
2. Bai Y., Chen H., Yuan Z.W., Wang W. Normal and abnormal embryonic development of the anorectum in rats. *J. Pediatr. Surg.* 2004;39(4):587–590. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2003.12.002.
3. Bustin S., Nolan T. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research. *Eur. J. Clin. Invest.* 2017;47(10):756–774. DOI: 10.1111/eci.12801.
4. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009;55(4):611–622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
5. Eraky S.M., El-Mesery M., El-Karef A., Eissa L.A., El-Gayar A.M. Silymarin and caffeine combination ameliorates experimentally-induced hepatic fibrosis through down-regulation of LPAR1 expression. *Biomed. Pharmacother.* 2018;101:49–57. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.064.
6. Everhart J.E., Wright E.C., Goodman Z.D., Dienstag J.L., Hoefs J.C., Kleiner D.E., Ghany M.G., Mills A.S., Nash S.R., Govindarajan S., Rogers T.E., Greenon J.K., Brunt E.M., Bonkovsky H.L., Morishima Ch., Litman H.J., HALT-C Trial Group. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: Findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology*. 2010;51(2):585–594. DOI: 10.1002/hep.23315.
7. Fiddler J.L., Clarke S.L. Evaluation of candidate reference genes for quantitative real-time PCR analysis in a male rat model of dietary iron deficiency. *Genes Nutr.* 2021;16(1):17. DOI: 10.1186/s12263-021-00698-0.
8. Giri A., Sundar I.K. Evaluation of stable reference genes for qPCR normalization in circadian studies related to lung inflammation and injury in mouse model. *Sci. Rep.* 2022;12(1):1764. DOI: 10.1038/s41598-022-05836-1.
9. Hayakawa K., Nakanishi M.O., Ohgane J., Tanaka S., Hirotsawa M., Soares M.J., Yagi S., Shiota K. Bridging sequence diversity and tissue-specific expression by DNA methylation in genes of the mouse prolactin superfamily. *Mamm. Genome*. 2012;23(5–6):336–345. DOI: 10.1007/s00335-011-9383-x.
10. Hlaváčková M., Kožichová K., Neckář J., Kolář F., Musters R.J.P., Novák F., Nováková O. Up-regulation and redistribution of protein kinase C- δ in chronically hypoxic heart. *Mol. Cell. Biochem.* 2010;345(1–2):271–282. DOI: 10.1007/s11010-010-0581-8.
11. Klenke S., Renckhoff K., Engler A., Peters J., Frey U.H. Easy-to-use strategy for reference gene selection in quantitative real-time PCR experiments. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2016;389(12):1353–1366. DOI: 10.1007/s00210-016-1305-8.
12. Li Y., Xu Y., Wang R., Li W., He W., Luo X., Ye Y. Expression of Notch-Hif-1 α signaling pathway in liver regeneration of rats. *J. Int. Med. Res.* 2020;48(9):30060520943790. DOI: 10.1177/0300060520943790.
13. Liu W., Yu J., Wang Y-F., Shan Q-Q., Wang Y-X. Selection of suitable internal controls for gene expression normalization in rats with spinal cord injury. *Neural Regen. Res.* 2022;17(6):1387–1392. DOI: 10.4103/1673-5374.327350.
14. Lu X., Liu Y., Zhang D., Liu K., Wang Q., Wang H. Determination of the panel of reference genes for quantitative real-time PCR in fetal and adult rat intestines. *Reprod. Toxicol.* 2021;104:68–75. DOI: 10.1016/j.reprotox.2021.07.001.
15. Meng Q., Shu B., Sun S., Wang Y., Yang M., Zhu E., Liu A., Gao S., Gou Y., Wang Z. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in the coffee white stem borer, *Xylocopa quadripes Chevrolat* (Coleoptera: Cerambycidae). *Bull. Entomol. Res.* 2022;112(2):151–161. DOI: 10.1017/S0007485321000596.
16. Ruiz-Villalba A., Ruijter J.M., van den Hoff M.J.B. Use and misuse of Cq in qPCR data analysis and reporting. *Life (Basel)*. 2021;11(6):496. DOI: 10.3390/life11060496.
17. Sanders R., Mason D.J., Foy C.A., Huggett J.F. Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014;406(26):6471–6483. DOI: 10.1007/s00216-014-7857-x.
18. Schwarz A.P., Kovalenko A.A., Malygina D.A., Postnikova T.Y., Zubareva O.E., Zaitsev A.V. Reference gene validation in the brain regions of young rats after pentylentetrazole-induced seizures. *Biomedicines*. 2020;8(8):239. DOI: 10.3390/biomedicines8080239.
19. Schwarz A.P., Malygina D.A., Kovalenko A.A., Trofimov A.N., Zaitsev A.V. Multiplex qPCR assay for assessment of reference gene expression stability in rat tissues/samples. *Mol. Cell. Probes*. 2020;53:101611. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101611.
20. Svingen T., Letting H., Hadrup N., Hass U., Vinggaard A.M. Selection of reference genes for quantitative

tive RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *Peer J.* 2015;3:e855. DOI: 10.7717/peerj.855.

21. Taylor S.C., Nadeau K., Abbasi M., Lachance C., Nguyen M., Fenrich J. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data

the first time. *Trends Biotechnol.* 2019;37(7):761–774. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.12.002.

22. Yang Z., Gao L., Jia H., Bai Y., Wang W. The expression of Shh, Ptc1, and Gli1 in the developing caudal spinal cord of fetal rats with anorectal malformations. *J. Surg. Res.* 2019;233:173–182. DOI: 10.1016/j.jss.2018.08.006.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Лебедева Елена Ивановна*, к.б.н., доц., учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

e-mail: lebedeva_ya-elenale2013@yandex.ru

Бабенко Андрей Сергеевич, к.х.н., доц., учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Щастный Анатолий Тадеушевич, д.м.н., проф., учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

e-mail: admin@vsmu.by

Elena I. Lebedeva*, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

e-mail: lebedeva_ya-elenale2013@yandex.ru

Andrei S. Babenko, Cand. Sci. (Chem.), Assoc. Prof., Belarussian State Medical University

Anatoly T. Shchastniy, Dr. Sci. (Med.), Prof., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

e-mail: admin@vsmu.by

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ГЕЛЕВОГО РАСТВОРА С АГАРОМ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СРЕЗОВ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ИХ ДЛИТЕЛЬНОГО КРИОСОХРАНЕНИЯ

А.А. Мокрушин

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

Биотехнология криосохранения позволяет длительно сохранять и восстанавливать биологические объекты. Она необходима для создания криобанка. Мы разработали двухкомпонентный замораживающий раствор, состоящий из искусственной цереброспинальной жидкости и агара в различных концентрациях. Эффективность раствора для длительного криосохранения (-10°C , 52 сут.) была исследована на переживающих срезах обонятельной коры мозга негипернуряющих животных — крыс. В качестве функциональных индикаторов успешного криосохранения жизнеспособности срезов мозга были изучены изменения активностей α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты (АМПА) и N-метил-D-аспартата (НМДА) глутаматергических механизмов. Были использованы различные концентрации агара: 33%, 44% и 50%. При концентрации 33% наблюдалась гиперактивация АМПА и восстановление НМДА механизмов по сравнению со значениями до криосохранения. При концентрации агара 44% происходила гиперактивация обоих механизмов. Полное восстановление активностей АМПА и НМДА механизмов после длительного криосохранения было достигнуто при концентрации агара 50%. Разработанный и исследованный нами замораживающий раствор на основе агара не содержит «тяжёлых» протекторов (диметилсульфоксида), антибиотиков, а также катионов, таких как Ba^{2+} и Sr^{2+} , которые приводят к необратимой блокаде АМПА и НМДА механизмов. Таким образом, замораживающий раствор на основе агара способствует сохранению высокого уровня активности АМПА и НМДА механизмов в переживающих срезах при криосохранении. Разработанный раствор можно использовать для создания криобанка нервной ткани.

Ключевые слова: срезы мозга крыс, криосохранение, агар, АМПА, НМДА механизмы, замораживание/отогревание

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности: автор выражает признательность Г.П. Смирновой за помощь при проведении экспериментов, С.Е. Боровикову — за техническую помощь в наладке и обслуживании электрофизиологической установки.

Для цитирования: Мокрушин А.А. Метод получения и изучения гелевого раствора с агаром для сохранения электрической активности срезов мозга крыс после их длительного криосохранения. *Биомедицина*. 2022;18(2):31–39. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-31-39>

Поступила 08.02.2022

Принята после доработки 25.04.2022

Опубликована 10.06.2022

A METHOD FOR OBTAINING AND STUDYING A GEL AGAR-BASED MEDIUM TO PRESERVE THE ELECTRICAL ACTIVITY OF RAT BRAIN SLICES AFTER THEIR LONG-TERM CRYOPRESERVATION

Anatoliy A. Mokrushin

*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences
199034, Russian Federation, St. Petersburg, Makarova Embankment, 6*

Cryopreservation biotechnology allows a long-term preservation makes it possible to preserve and subsequent recovery of biological objects for a long time. This technology is used for creating is necessary to create a cryobanks. In this work, we have developed a two-component freezing solution consisting of an artificial cerebrospinal fluid and agar in different concentrations. The effectiveness of the solution in terms of long-term cryopreservation was investigated on surviving slices of the olfactory cortex of the brain of such non-hibernating animals – as rats. Changes Variations in the activities of AMPA and NMDA glutamatergic mechanisms in brain slices were studied as functional indicators of successful cryopreservation. The following agar Different concentrations of agar were used: 33%, 44% and 50%. At a concentration of 33% agar, AMPA hyperactivation and recovery of NMDA recovery mechanisms were observed. At a concentration of 44% agar, hyperactivation of both mechanisms occurred. A cComplete recovery of the activities of the AMPA and NMDA mechanisms after prolonged cryopreservation (–10°C, 52 days) was achieved at an agar concentration of 50%. The developed freezing agar-based freezing solution developed and studied by us does not contains no “heavy” protectors (DMSO), antibiotics, and cations, such as Ba²⁺ and Sr²⁺, which normally lead to an irreversible blockade of AMPA and NMDA mechanisms. Thus, an the agar-based freezingdeveloped solution solution helpscontributes to maintaining a high level of activity of AMPA and NMDA activity mechanisms in slices during their cryopreservation. The developed solution can be used to create a cryobank of nervous tissue.

Keywords: rat brain slices, cryopreservation, agar, AMPA, NMDA mechanisms, freezing/thawing

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

Acknowledgment: the author is grateful to G.P. Smirnova for her help with the experiments, S.E. Borovikov for technical assistance in installing and operating the electrophysiological setup.

For citation: Mokrushin A.A. A Method for Obtaining and Studying a Gel Agar-Based Medium to Preserve the Electrical Activity of Rat Brain Slices after their Long-Term Cryopreservation. *Journal Biomed.* 2022;18(2):31–39. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-31-39>

Submitted 08.02.2022

Revised 25.04.2022

Published 10.06.2022

Введение

В настоящее время в криобиологии разрабатываются замораживающие р-ры для успешного и длительного низкотемпературного криосохранения биологических объектов. Особенная сложность создания таких р-ров возникает при криосохранении нервной ткани. Это связано с тем, что нервные структуры гетерогенны (нейроны, синапсы, мембранные рецепторы) и неодинаково реагируют на криосохране-

ние и последующее отогревание. Различие также проявляется в химических процессах, которые могут быть неодинаково уязвимы к действию низкотемпературного воздействия, которые приводят к повреждению нервной ткани. Для устранения таких криоповреждений необходим особый подход к созданию замораживающих р-ров.

Существуют коммерчески доступные замораживающие препараты для хранения биологических р-в нервных клеток. Такие р-ры,

как «CryoStor10 (CS10)», «Hibernate-A», «Hibernate-E», применяются для замораживания гепатоцитов, клеточных элементов крови, стволовых и раковых клеток. Однако их серьёзным недостатком является наличие в них 10% диметилсульфоксида (ДМСО). Установлено, что ДМСО является «тяжёлым» протектором и необратимо блокирует активность нервных клеток срезов мозга [4]. Другим недостатком является глубокое замораживание (-80°C , -196°C) биологических объектов. Такая глубина замораживания приводит к необратимому изменению конформаций внутриклеточных белковых структур и блокаде клеточных функций [7]. Таким образом, по характеристикам эти замораживающие р-ры не являются оптимальными для длительного криосохранения нервной ткани мозга.

Замораживающие р-ры «Neurostore» («Sigma-Aldrich», США), «CryoStor10» («Thermo Fisher», США) специально разработаны для замораживания и криосохранения эмбриональных нейронов из гиппокампа и кортикальных структур мозга крыс. При использовании такого р-ра было обнаружено, что жизнеспособность криосохранённых нейронных культур уменьшалась по сравнению с активностью нейронов до замораживания, что указывает на невысокую эффективность этих р-ров [9, 12, 13]. Причина заключается в том, что в них содержится «тяжёлый» протектор ДМСО, а также антибиотики пенициллин и стрептомицин. Последние, как известно, вызывают гипертоническую эпилепсию в нервной ткани, приводящую к возникновению эпилептических разрядов. Кроме того, глубина криосохранения составляет -80°C , что вызывает необратимые конформационные изменения внутриклеточных ферментов [7]. Следовательно, использование таких р-ров для криосохранения эксплантатов (срезов) мозга теплокровных является нецелесообразным.

Для повышения эффективности криосохранения нервных механизмов в последнее время применяются альгинатные гидрогели в качестве основы для создания криозащитной среды [8, 15]. Существенным недостатком таких р-ров является наличие в их составе двухвалентных катионов Ba^{2+} и Sr^{2+} . Известно, что эти компоненты замораживающих р-ров необратимо блокируют синаптическую активность и, следовательно, после цикла замораживания/отогревания не способствуют сохранению активности синаптических механизмов в эксплантатах мозга. Кроме того, использование таких р-ров связано с добавлением «жестких» криопротекторов (ДМСО), которые необратимо нарушают функции нейронов, синапсов и уменьшают протективный потенциал таких замораживающих р-ров.

Для устранения недостатков существующих криозамораживающих р-ров в настоящей работе мы разработали замораживающие р-ры с добавлением агара в солевой р-р, имитирующий искусственную цереброспинальную жидкость (ИЦЖ). Агар является природным полимером, который используется в биологии и медицине, благодаря его биосовместимости с живыми объектами. Агар в качестве криопротектора нервной ткани ранее не использовался. Мы полагаем, что создание замораживающего р-ра на основе агара будет способствовать сохранению активности нервных структур мозга. Для изучения эффективности таких р-ров мы использовали переживающие срезы обонятельной коры мозга крыс. В срезах мы тестировали эффективность замораживающего р-ра на сохранение активностей глутаматергических ионотропных α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты (АМПА) и N-метил-D-аспартата (НМДА) рецепторных механизмов [11]. Длительность криосохранения срезов мозга при температуре -10°C составляла 52 сут.

Материалы и методы

В исследованиях использовались белые крысы-самцы Wistar массой 180–200 г. Все эксперименты проведены на крысах из биocolлекции «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, предложенными European Communities Council Directive (86/609 ЕЕС). Опыты с животными были проведены в строгом соответствии с Руководством Совета Федерации по уходу и использованию лабораторных животных (1994 г.) и с руководящими принципами этического кодекса Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (1996 г.).

В настоящей работе были исследованы протективные эффекты криосохранения срезов обонятельной коры (клеточная культура) в замораживающем р-ре, состоящем из ИЦЖ и агара в различных концентрациях. Такой р-р для криосохранения срезов был двухкомпонентным и готовился в следующей последовательности (рис. 1).

В качестве исходного компонента для изготовления замораживающего р-ра была ИЦЖ. Её состав (мМ): NaCl — 124,0; KCl — 5,0; CaCl₂ — 2,6; KН₂PO₄ — 1,24; MgSO₄ — 1,2; NaHCO₃ — 3,0; глюкоза — 10,0; трис-НСl — 23,0; рН 7,2–7,3. В неё входят необходимые ионы и катионы (аналогично *in vivo*) для поддержания электри-

ческой активности нейронов срезов мозга, а также глюкоза для энергетического обеспечения их активности. Концентрация ионов была оптимизирована для длительной (10 ч и более) жизнедеятельности срезов мозга [10]. Важным компонентом ИЦЖ является буферная ёмкость р-ра. Она образована из гибридной буферной системы: карбонатный буфер, NaHCO₃; фосфатный буфер, KН₂PO₄; трис(гидроксиметил)аминометан, (НОСН₂)₃CNH₂. Такая буферная система обеспечивает электрическую активность нейронов в диапазоне рН 7,2–7,4. Среда с такими характеристиками способствует длительному поддержанию активности нейронов срезов мозга крыс [3].

Другим компонентом для приготовления замораживающей среды был естественный полимер агар. Первоначально для получения агара были использованы водоросли Белого моря (Россия). Однако получить и очистить агар в лабораторных условиях в достаточном количестве было сложно. Далее в наших опытах был использован порошкообразный агар Difco Vactor (США). Выбор этого типа агара был основан тем, что в нём отсутствуют токсические катионы (Cu²⁺, Ba²⁺), которые могут ингибировать функционирование нейронов и синапсов.

Замораживающий р-р был приготовлен в два этапа. На первом этапе получали гелевый р-р агара. Для этого агар-порошок (3 г) заливали 100 мл 1 М NaCl и выдерживали 10 дней в термостате при темпе-

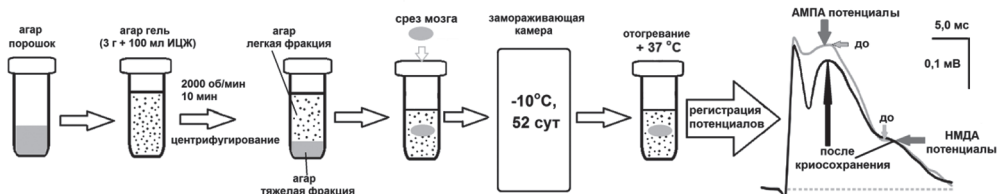


Рис. 1. Приготовление раствора для криосохранения срезов обонятельной коры головного мозга.
 Fig. 1. Preparation of a solution for cryopreservation of sections of the olfactory cortex of the brain.

ратуре +32...+35°C. Полученный гелевый р-р центрифугировали (Электрон П10-0.1, Россия) при скорости 2000 об./мин в течение 10 мин. Лёгкую фракцию отсасывали из р-ра и использовали для последующего приготовления замораживающей среды для криосохранения срезов. Тяжёлая фракция агара не использовалась из-за неоднородности её состава.

На втором этапе были приготовлены замораживающие р-ры для криосохранения срезов в следующей последовательности. Для получения этих р-в с разной концентрацией агара использовалась его лёгкая фракция с добавлением ИЦЖ. Р-р с концентрацией агара 33% состоял из 0,5 мл лёгкой фракции агара и 1,0 мл ИЦЖ. Р-р с концентрацией агара 44% состоял из 0,8 мл лёгкой фракции агара и 1,0 мл ИЦЖ. Р-р с концентрацией агара 50% состоял из 1,0 мл лёгкой фракции агара и 1,0 мл ИЦЖ.

Срезы головного мозга помещали в стеклянные флаконы с этими р-рами. Затем флаконы со срезами постепенно замораживали до -10°C при медленной скорости (0,1°C/мин) в морозильной камере с термостатом ThermoStat plus («Eppendorf», Германия) в течение 52 сут. Через 52 сут. флаконы со срезами отогревали до +37°C с медленной скоростью 0,1°C/мин.

Исследования протективных эффектов замораживающего р-ра проводились на тангенциальных срезах толщиной 400–500 мкм, которые изготавливали устройством Емельянова (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН) из мозга крыс-самцов Wistar (13 животных). Каждый срез преинкубировали отдельно в стеклянных виалах ИЦЖ (без агара) объёмом 1 мл в аппарате Варбурга (Модель ВА 01 10, Германия) при температуре +37°C с частотой качания 120/мин в течение 2 ч, что имитирует кровообращение в мозге.

После преинкубации срезов в течение 2 ч (без агара) их по одному извлекали из флаконов, помещали в проточную регистри-

рующую камеру электрофизиологической установки [1] и перфузировали со скоростью 2 мл/мин ИЦЖ (солевой состав указан выше). В течение 15 мин срезы перфузировали ИЦЖ без агара. В срезах экстракционно регистрировали АМПА и НМДА потенциалы стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl сопротивлением 1–5 МОм в ответ на электрическую стимуляцию одиночными импульсами (ЭСУ-1, Россия) латерального обонятельного тракта [2]. Потенциалы оцифровывали аналогоцифровым интерфейсом (Е 20-10, Россия) с частотой квантования 25 кГц и обрабатывали на компьютере с помощью специальной программы. Полученные значения амплитуд АМПА и НМДА потенциалов были контрольными до криосохранения срезов без агара.

Затем, после регистрации в срезах контрольных значений АМПА и НМДА потенциалов, их переносили в виалы с замораживающими р-ми с агаром при температуре +37°C в различных концентрациях: 33%, 44% и 50%. Далее виалы со срезами помещали в морозильную камеру с термостатом ThermoStat plus («Eppendorf, Германия») и замораживали с медленной (0,1°C/мин) скоростью до температуры -10°C. При этой температуре срезы сохраняли в течение 52 сут. Спустя это время виалы со срезами отогревали с медленной скоростью 0,1°C/мин до +37°C. Затем в каждом срезе регистрировали АМПА и НМДА потенциалы. Значение их амплитуд выражали в процентах по отношению к контрольным потенциалам (до криосохранения).

В данном исследовании криопротекторы — такие, как диметилсульфоксид, этиленгликоль, глицерин, 1,2-пропандиол, диметилформамид и др., — не использовали, поскольку они необратимо блокируют активность нейронов и синапсов [4], в т. ч. активности АМПА и НМДА механизмов.

Химические реактивы для получения замораживающих растворов были при-

бретены в фирмах «Химреактив» (Россия) и «Difco Vactor agar» (США).

Для статистической обработки данных применяли непараметрический U-критерий Уилкоксона–Манна–Уитни. Числовые данные были выражены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (S.E.M.). Уровень статистической значимости был на уровне $p \leq 0,05$.

Результаты исследований

Протективные эффекты замораживающего р-ра, состоящего из ИЦЖ и лёгкой фракции агара с различными концентраци-

ями, были проанализированы на сохранение и восстановление активностей АМПА и НМДА потенциалов в срезах после их длительного криосохранения и последующего отогревания до $+37^\circ\text{C}$.

После криосохранения срезов в замораживающем р-ре с концентрацией агара 33% было выявлено, что амплитуда АМПА потенциалов увеличивалась в среднем на $59 \pm 7\%$ ($n=7$) по сравнению с амплитудой АМПА потенциалов до криосохранения (контроль): температура $+37^\circ\text{C}$ — 100% *vice versa* после криосохранения $159 \pm 12\%$, $p \leq 0,05$, $U=5$, $n=7$ (рис. 2А). Такие измене-

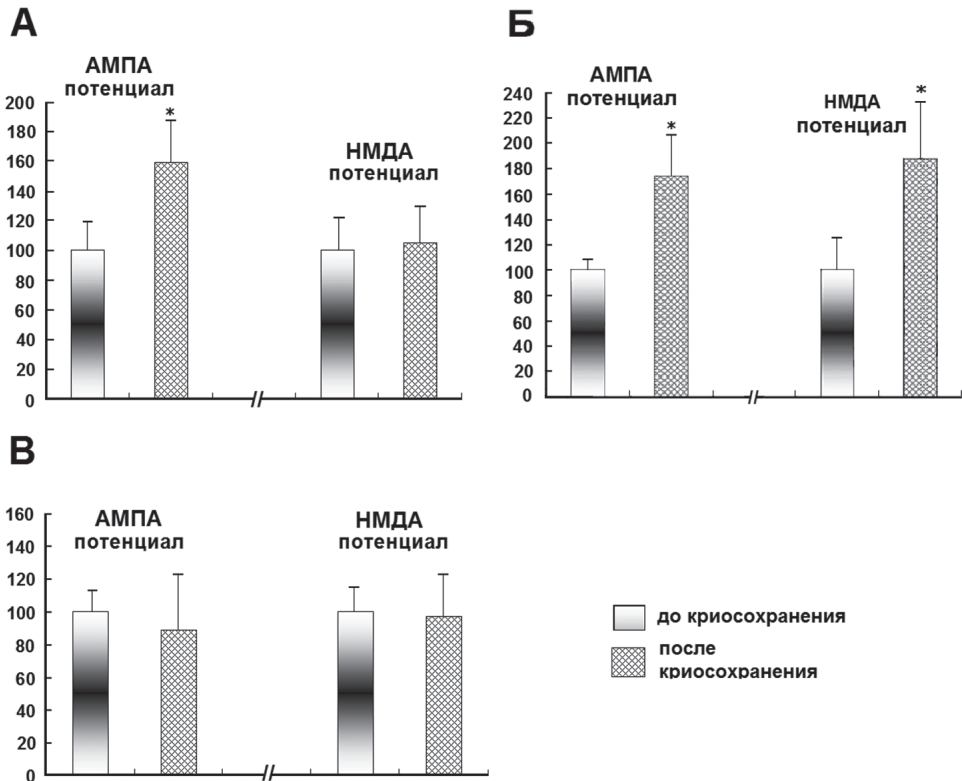


Рис. 2. Значения АМПА и НМДА потенциалов до и после криоконсервации срезов обонятельной коры головного мозга крысы.

Fig. 2. Values of AMPA and NMDA potentials before and after cryopreservation of sections of the olfactory cortex of the rat brain.

ния АМПА потенциалов свидетельствуют о гиперактивации АМПА механизмов после криосохранения (рис. 2А).

При концентрации агара 33% в замораживающей среде амплитуда НМДА потенциалов, в отличие от амплитуды АМПА потенциалов, статистически не отличалась от значений до криосохранения: контроль (до криосохранения, температура +37°C) — 100% *vice versa* после криосохранения 105±7%, $p \leq 0,05$; $U=4$, $n=7$ (рис. 2А). Полученные данные указывают, что АМПА и НМДА механизмы восстанавливаются после длительного криосохранения. Однако степени восстановления этих механизмов различны: АМПА механизмы усиливаются, НМДА — восстанавливаются. Очевидно, криосохранение срезов в замораживающем р-ре в концентрации 33% не является оптимальным для сохранения активности АМПА, но способствует восстановлению НМДА механизмов.

Для достижения равноценного восстановления АМПА и НМДА механизмов был исследован замораживающий р-р с концентрацией агара 44%. Было обнаружено, что амплитуды АМПА и НМДА потенциалов статистически достоверно увеличивались на 74±8% и 87±9% соответственно, $p \leq 0,05$; $U=5$, $n=7$ (рис. 2Б). Эти данные свидетельствуют о гиперактивации как АМПА, так и НМДА механизмов после криосохранения. Следовательно, несмотря на то, что активности АМПА и НМДА механизмов восстанавливаются после криосохранения в замораживающем р-ре с концентрацией агара 44%, но уровни их активностей чрезмерны и не являются оптимальными.

Для получения полного сохранения активностей АМПА и НМДА потенциалов, равных по их значениям до криосохранения, концентрация агара в замораживающем р-ре была увеличена до 50%. В результате проведённых исследований было выявлено восстановление активностей этих механизмов. АМПА: контроль (до криосохране-

ния, температура +37°C) — 100% *vice versa* после криосохранения — 88±6%, $p \geq 0,05$; $U=10$, $n=7$, т. е. различия статистически недостоверны (рис. 2В). Амплитуда НМДА потенциалов после отогревания была равна значениям до криосохранения: контроль (до криосохранения, температура +37°C) — 100% *vice versa* после криосохранения — 97±9%, $p \geq 0,05$; $U=12$; $n=7$ (рис. 2В).

Таким образом, сопоставляя полученные результаты восстановления активности как АМПА, так и НМДА механизмов после криосохранения в замораживающем р-ре с концентрацией агара 50%, можно утверждать, что он способствует защите этих механизмов.

Обсуждение результатов

В настоящей работе представлены результаты получения и исследования замораживающего р-ра, состоящего из ИЦЖ и агара в различных концентрациях, для длительного криосохранения эксплантатов (срезов) мозга. Считается, что агар является подходящим биоматериалом для имитации каркасов внеклеточного матрикса с пористой структурой. Учитывая эти свойства агара, мы надеялись получить протективный эффект сохранения активности АМПА и НМДА механизмов. В качестве функциональных индикаторов успешного криосохранения были изучены изменения активностей АМПА и НМДА глутаматергических механизмов.

Хотя были использованы различные концентрации агара, полное восстановление активностей АМПА и НМДА механизмов после длительного криосохранения (−10°C, 52 сут.) было достигнуто при концентрации агара 50%. Эти данные свидетельствуют о зависимости протективных свойств замораживающего р-ра от концентраций агара. Следовательно, при последующем составлении замораживающих р-ров на основе агара и их исследовании следует учитывать концентрационные характеристики.

Рассмотрим протективный потенциал агара. Принимая во внимание величину молекулярного веса агара (32–200 кДа), его следует отнести к непроницающему типу криопротекторов. По химической природе агар является биополимером, макромолекулы которого образованы двумя полисахаридами — агарозы и агаропектина. Агароза, входящая в состав агара (50–80%), представляет собой линейный полисахарид и рассматривается как менее высокомолекулярная фракция полимера, тогда как агаропектин имеет сетчатую структуру с большей молекулярной массой [5, 6, 14]. Установлено, что агар при формировании геля проявляет высокую гидратационную способность, позволяющую создавать устойчивые структуры с молекулами воды. Вероятно, что абсорбция агаром молекул воды из внеклеточного пространства срезов создаёт защиту мембран нервных клеток от осмотических напряжений, уменьшению образованию кристаллов льда и их разрушительного воздействия на мембраны в процессе криосохранения [5].

Сопоставляя эффективность разработанного нами замораживающего р-ра на основе агара с характеристиками существующих замораживающих р-ров, например, «CryoStor10 (CS10)», «Hibernat-A», «Hibernat-E», «Neurostore» и др., следует

отметить, что они проявляли бы существенные негативные воздействия на активности синаптических глутаматергических ионотропных механизмов (АМПА, НМДА), поскольку в их составе содержатся «тяжёлый» криопротектор (ДМСО), антибиотики (пенициллин и стрептомицин), а также катионы, такие как Ba^{2+} и Sr^{2+} , приводящие к необратимой блокаде АМПА и НМДА механизмов.

Закключение

Таким образом, представленные данные доказывают, что замораживающий р-р, состоящий из искусственной цереброспинальной жидкости и агара в различных концентрациях, защищает АМПА и НМДА механизмы от криповреждений при их длительном криосохранении ($-10^{\circ}C$, 52 сут.). Исследованные механизмы демонстрируют восстановление электрической активности (до 100%) по сравнению со значениями до криосохранения. Эти данные, впервые полученные, доказывают, что агар является эффективным нейропротектором. Мы полагаем, что разработанный нами замораживающий р-р для криосохранения эксплантатов головного мозга (срезов) негибрирующих теплокровных животных будет использован для создания биобанка нервной ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. 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 perezhivayushchih srezah mozga teplokovnykh]. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh fundamental'nykh issledovaniy [International Journal of Applied Fundamental Research]*. 2017;2(2):214–217. (In Russian)].
2. Мокрушин А.А. Криосохранение срезов мозга крыс с различной длительностью и восстановление их электрической активности. *Биомедицина*. 2019;15(4):98–106. [Mokrushin A.A. Kriosohranenie srezov mozga krys s razlichnoy dlitel'nost'yu i vosstanovlenie ih elektricheskoy aktivnosti]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(4):98–106. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-4-98-106.
3. Мокрушин А.А. Оптимизация кислотно-щелочного состава инкубационной среды для длительной и обратимой криоконсервации срезов мозга негибрирующих животных. *Биофизика*. 2021;66(5):954–963. [Mokrushin A.A. Optimizatsiya kislotno-shchelochno-go sostava inkubatsionnoy sredy dlya dlitel'noy i obratimoy kriokonservatsii srezov mozga negiberniruyushchih zhivotnykh]. *Biofizika [Biophysics]*. 2021;66(5):954–963. (In Russian)]. DOI: 10.1070/biophysics.2021.66.5.954-963.

- 2021;66(5):954–963. (In Russian)]. DOI: 10.31857/S0006302921050136.
4. Пичугин Ю.И. *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии*. М.: Научно-технический центр криобиологии и анабиоза, 2013:60–62. [Pichugin Yu.I. *Teoreticheskie i prakticheskie aspekty sovremennoj kriobiologii [Theoretical and practical aspects modern cryobiology]*. Moscow: Nauchno-tehnicheskij centr kriobiologii i anabioza Publ., 2013:60–62. (In Russian)].
 5. Шипунов Б.П., Коптев В.Е., Маркин В.И. Особенности реологии растворов агар-агара. *Химия растительного сырья*. 2018;1:53–60. [Shipunov B.P., Kopcev V.E., Markin V.I. Osobennosti reologii rastvorov agar-agara [Rheology features of agar-agar solutions]. *Himiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of vegetable raw materials]*. 2018;1:53–60. (In Russian)].
 6. Усов А.И. Проблемы и достижения в структурном анализе сульфатированных полисахаридов красных водорослей. *Химия растительного сырья*. 2001;2:7–20. [Usov A.I. Problemy i dostizheniya v strukturnom analize sul'fatirovannyh polisaharidov krasnyh vodoroslej [Problems and achievements in the structural analysis of sulfated polysaccharides of red algae]. *Himiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of vegetable raw materials]*. 2001;2:7–20. (In Russian)].
 7. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*. 2009;5:119–126. DOI: 10.4161/org.5.3.9583.
 8. Benson E.E., Harding K., Ryan M., Petrenko A., Petrenko Y. Alginate encapsulation to enhance biopreservation scope and success: A multidisciplinary review of current ideas applications in cryopreservation and non-freezing storage. *Cryoletters*. 2018;39(1):14–38.
 9. Day A.G.E., Bhangra K.S., Murray-Dunning C., Stevanato L., Phillips J.B. The effect of hypothermic and cryogenic preservationon engineered neural tissue. *Tissue engineering. Part C: Methods*. 2017;23(10):575–582. DOI: 10.1089/ten.TEC.2017.0244.
 10. Mokrushin A.A., Pavlinova L.I. Effects of the blood components on the AMPA and NMDA synaptic responses in brain slices in the onset of hemorrhagic stroke. *Gen. Physiol. Biophys.* 2013;32(4):489–504. DOI: 10.4149/gpb_2013038.
 11. Mokrushin A.A. Effects cryopreservation of ionotropic glutamatergic receptor mechanisms in vitro. *CryoLetters*. 2015;36(6):367–377.
 12. Parker S.S., Moutal A., Cai S., Chandrasekaran S., Roman M.R., Koshy A.A., Khanna R., Zinsmaier K.E., Mouneimne G. High fidelity cryopreservation and recovery of primary rodent cortical neurons. *eNeuro*. 2018;5(5):Eneuro 0135-18. DOI: 10.1523/ENEURO.0135-18.2018.
 13. Pischedda F., Montani C., Obergasteiger J., Frapporti G., Corti C., Rosato Siri M., Volta M., Piccoli G. Cryopreservation of primary mouse neurons: The benefit of neurofreezing cryoprotective medium. *Front. Cell. Neurosci.* 2018;12:81. DOI: 10.3389/fn-cel.2018.00081.
 14. Sousa A.M., Borges J., Silva A.F., Gonçalves M.P. Influence of the extraction process on the rheological and structural properties of agars. *Carbohydr. Polym.* 2013;96(1):163–171. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.03.070.
 15. Zhang C., Zhou Y., Zhang L., Wu L., Chen Y., Xie D., Chen W. Hydrogel cryopreservation system: An effective method for cell storage. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(11):3330. DOI: 10.3390/ijms19113330.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-40-45>



АНАЛИЗ СПОНТАННЫХ СООБЩЕНИЙ КАК «ИНСТРУМЕНТ» ФАРМАКОНАДЗОРА

Т.С. Литвиненко, А.В. Сафроненко, Ю.С. Макляков, Е.В. Ганцгорн*,
Е.С. Постникова, М.О. Гайсаев, В.Г. Брижак

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России
344022, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

Статья посвящена приоритетной для здравоохранения в целом и фармакологии в частности проблеме — нежелательным лекарственным реакциям. Приведены современные данные об их распространённости в мире и системе спонтанных сообщений как методическом подходе к их мониторингу. Представлены результаты анализа спонтанных сообщений о нежелательных лекарственных реакциях, зарегистрированных в Ростовской области за 2020 г.

Ключевые слова: нежелательная лекарственная реакция, безопасность фармакотерапии, фармаконадзор

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Литвиненко Т.С., Сафроненко А.В., Макляков Ю.С., Ганцгорн Е.В., Постникова Е.С., Гайсаев М.О., Брижак В.Г. Анализ спонтанных сообщений как «инструмент» фармаконадзора. *Биомедицина*. 2022;18(2):40–45. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-40-45>

Поступила 20.03.2022

Принята после доработки 25.04.2022

Опубликована 10.06.2022

ANALYSIS OF SPONTANEOUS REPORTS AS A METHODOLOGICAL PHARMACOVIGILANCE TOOL

Tatyana S. Litvinenko, Andrey V. Safronenko, Yuri S. Maklyakov, Elena V. Gantsgorn*,
Elena S. Postnikova, Magomed O. Gaisaev, Victoria G. Brizhak

Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don, Nakhichevansky Lane, 29

This article deals with the problem of undesirable drug reactions (UDR), having particular importance for both pharmacology and the healthcare system as a whole. Up-to-date information on the global prevalence of UDR is presented. A methodological approach to monitoring UDR based on a system of spontaneous reporting (SR) is proposed. An analysis of SR on UDR registered in the Rostov region in 2020 is conducted.

Keywords: undesirable drug reaction, drug safety, pharmacovigilance

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

For citation: Litvinenko T.S., Safronenko A.V., Maklyakov Y.S., Gantsgorn E.V., Postnikova E.S., Gaisaev M.O., Brizhak V.G. Analysis of Spontaneous Reports as a Methodological Pharmacovigilance Tool. *Journal Biomed*. 2022;18(2):40–45. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-40-45>

Submitted 20.03.2022

Revised 25.04.2022

Published 10.06.2022

Введение

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определяет нежелательную лекарственную реакцию (НЛР) как «любой непреднамеренный и вредный для организма человека эффект в условиях применения лекарственного средства (ЛС) в стандартной дозе». При этом необходимо отметить, что НЛР неэквивалентна понятию «побочный эффект», с позиций фундаментальной фармакологии определяемому как эффект, будь то терапевтический или неблагоприятный, который является вторичным по отношению к основному действию ЛС, и хотя побочные эффекты преимущественно имеют негативный характер, иногда они оказываются благоприятными [3].

НЛР имеют широкую распространённость: по усреднённым статистическим данным, на 2019 г. было зафиксировано до 2 млн серьёзных НЛР в мире, из которых около 100–240 тыс. имели летальные последствия. Даже в развитых странах мира лекарственно-ассоциированные осложнения развиваются у миллионов людей, а смертность в результате НЛР выходит на 4–5-е место после сердечно-сосудистых, онкологических, бронхо-лёгочных заболеваний и травм [8]. Масштабный детальный анализ медицинских карт пациентов демонстрирует, что частота госпитализаций, связанных с НЛР, варьирует от 2,3 до 21,2% в разных странах мира, при этом значительная часть данных осложнений потенциально предотвратима [5, 6, 7, 9, 10].

Таким образом, проблема безопасности лекарственной терапии и НЛР, безусловно, является приоритетной для мирового здравоохранения.

Учитывая масштабность проблемы НЛР, разработано и внедрено значительное число методик и систем мониторинга безопасности фармакотерапии. Важнейшую роль в мониторинге НЛР играют методы фармакоэпидемиологических исследований. Выбор того или иного метода зависит

от региональных особенностей территории (качество окружающей среды, развитость инфраструктуры региона, доступность в приобретении товаров и услуг), на которой осуществляется отслеживание, а также от целей и системности проводимых мероприятий. Важным этапом регистрации НЛР является установление причинно-следственной связи между применением лекарственного средства (ЛС) и нежелательным явлением. Реакция считается связанной с ЛС, если причинно-следственную связь нельзя исключить. Одной из эффективных систем, которая составляет основу фармаконадзора во многих странах мира, является система спонтанной отчётности, основным источником информации о НЛР в которой служат спонтанные сообщения (СС) [1].

К достоинствам метода СС можно отнести длительный контроль за ЛС в течение его пребывания на фармацевтическом рынке. Во-вторых, метод СС является точечным, благодаря чему возможные случаи НЛР могут быть зарегистрированы на малом количестве больных, что позволяет отслеживать и редкие случаи НЛР. В-третьих, простота использования и дешевизна этого метода делают его «рутинным» в системе фармаконадзора [2]. К основному ограничению метода СС следует отнести недостаточную активность всех субъектов обращения ЛС по выявлению и предоставлению информации о НЛР, что приводит к недооценке проблемы НЛР в целом и невозможности всестороннего, объективного её анализа [4].

Цель исследования — анализ спонтанных сообщений о нежелательных лекарственных реакциях и оценка их связи с индивидуальными особенностями пациентов и ЛС.

Материалы и методы

Было выполнено ретроспективное описательное исследование, объектом которого явились СС о НЛР при применении ЛС, за-

регистрированные в базе данных подсистемы «Фармаконадзор» — Автоматизированной информационной системы (АИС) Росздравнадзора — с 1 января 2020 г. по 31 декабря 2020 г. по Ростовской области. Общее число проанализированных СС составило 166.

Для систематизации ЛС применялась анатомо-терапевтическая и химическая классификационная система (АТХ-классификация ВОЗ). При установлении серьёзности НЛР использовались критерии, определённые Решением Совета Евразийской экономической комиссии «Об утверждении Правил надлежащей практики фармаконадзора Евразийского экономического союза» (2016). Тип НЛР определялся в соответствии с принятой классификацией ВОЗ.

Статистическая обработка полученных данных выполнена на ПК с использованием Microsoft Excel 2016, IBM SPSS Statistics v.26. Проверка на нормальность распределения количественных данных проводилась с помощью критерия Колмогорова – Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Сравнение количественных данных осуществлялось посредством U-критерия Манна–Уитни, сравнение номинальных и порядковых данных — посредством точного критерия Фишера, V-критерия Крамера. Корреляционный анализ выполнялся по коэффициенту Спирмена. Результаты корреляционного анализа интерпретировали по шкале Чеддока. Статистически значимыми принимались различия при $p < 0,005$.

Результаты и их обсуждение

Из 166 СС, зарегистрированных в Ростовской области за 2020 г., 108 (65,1%) случаев относились к пациентам женского пола, а 58 (34,9%), соответственно, — мужского пола. Средний возраст, представленный в виде Me (Q1–Q3), у женщин составил 39,0 (13,0–58,0) лет, у мужчин — 13,5 (10,0–46,0) года, а в среднем по выборке — 25,0 (11,0–55,5) лет.

Анализ структуры СС в зависимости от группы ЛС, вызвавшего НЛР, по АТХ-классификации позволил выявить, что максимальное число СС было связано с ЛС из групп «Нервная система» ($n=44$, 26,5%), «Противоопухолевые и иммуномодуляторы» ($n=30$, 18%), «Пищеварительный тракт и обмен веществ» ($n=28$, 16,8%) и «Дыхательная система» ($n=20$, 11,9%). Минимальное количество СС было связано с группами «Дерматология» ($n=6$, 3,6%) и «Прочее» ($n=3$, 1,8%). При этом СС по поводу НЛР, связанных с применением ЛС из групп «Гормоны для системного применения» и «Костно-мышечная система», зарегистрировано не было.

При анализе данных СС о НЛР при применении оригинальных и дженерических препаратов среди лиц женского и мужского пола статистически значимых результатов получено не было ($p=0,909$; ОШ=0,9; 95% ДИ: 0,5–1,9; $V=0,009$). Однако в общем соотношении среди лиц женского и мужского пола частота встречаемости НЛР была выше при применении дженерических препаратов.

Следует отметить, что при оценке частоты встречаемости случаев НЛР по отдельным группам ЛС, согласно АТХ-классификации ВОЗ, статистически значимых различий между оригинальными и дженерическими препаратами выявлено не было, по данным обращений как среди лиц мужского ($p=0,471$; $V=0,192$), так и женского пола ($p=0,457$; $V=0,186$).

Что касается характера НЛР согласно классификации ВОЗ, то тип реакции А (предсказуемые, дозозависимые) регистрировался у 89 (53,6%) пациентов, тип В (непредсказуемые, дозозависимые) — у 50 (30,1%) больных, а тип D (отсроченные) и Е (непредсказуемая неэффективность фармакотерапии) — в 5 (3%) и 22 (13,3%) случаях соответственно. НЛР типа С (НЛР, связанные с длительным применением ЛС) зарегистрированы не были.

По критерию серьезности НЛР распределялись следующим образом: «Клинически незначимое явление» — 21 (12,6%) случай, «Клинически значимое явление» — 83 (50%) СС, «Угроза жизни» — у 57 (34,4%) пациентов, «Госпитализация или продление её срока» — 5 (3%) наблюдений.

По исходу НЛР имели следующую структуру: «Выздоровление без последствий» — 36 (21,7%) случаев, «Улучшение состояния» — 96 (57,8%) человек, «Без изменений» — 24 (14,5%) наблюдения и, наконец, об исходе НЛР у 10 (6%) пациентов информация отсутствовала.

В ходе проведённого корреляционного анализа данных было установлено, что группа ЛС по АТХ-классификации не влияла на частоту НЛР ($p=0,163$; $V=0,244$), её тип ($p=0,009$; $V=0,405$), степень серьезности ($p=0,123$; $V=0,245$) и исход ($p=0,147$; $V=0,482$). Пол пациентов не влиял на частоту НЛР ($p=0,485$; $V=0,336$) и степень её серьезности ($p=0,163$; $V=0,244$), однако наблюдалась некая тенденция по отношению к характеру (типу) НЛР ($p=0,092$; $V=0,237$). При этом у пациентов женского пола было выявлено статистически значимое влияние критерия серьезности НЛР на её исход ($p=0,001$; $V=0,227$), чего не было отмечено среди лиц мужского пола ($p=0,078$; $V=0,628$). Возраст пациентов младше 18 лет имел статистически значимую корреляционную связь с исходом НЛР ($p=0,238$, $p<0,001$) слабой тесноты по шкале Чеддока.

Выводы

На основании анализа СС, зарегистрированных в 2020 г. в Ростовской области, можно резюмировать, что группа ЛС

по АТХ-классификации ВОЗ не была связана с частотой развития НЛР, её типом, степенью серьезности и исходом. Пол пациентов также не влиял на частоту, степень серьезности и тип НЛР. При этом у пациентов женского пола было выявлено статистически значимое влияние критерия серьезности НЛР на её исход ($p=0,001$; $V=0,227$). Возраст пациентов имел значимую корреляционную связь с исходом НЛР ($p=0,238$, $p<0,001$) слабой тесноты по шкале Чеддока.

Учитывая, что максимальное число СС было связано с ЛС из групп «Нервная система» (26,5%), «Противоопухолевые и иммуномодуляторы» (18%), «Пищеварительный тракт и обмен веществ» (16,8%) и «Дыхательная система» ($n=20$, 11,9%), назначение лекарственных препаратов из этих групп требует дополнительного контроля. Кроме этого, внимания и учёта заслуживают выявленные тенденции к увеличению частоты развития НЛР у пациентов женского пола в возрастной категории младше 18 лет.

Результаты данного анализа и подобных исследований могут быть использованы для разработки подходов к риск-ориентированному мониторингу и раннему выявлению НЛР, а, следовательно, — к оптимизации персонализированного подхода к выбору эффективной и максимально безопасной фармакотерапии.

Актуальными, на наш взгляд, аспектами научно-практического интереса для медицины в целом и фармакологии в частности, по-прежнему являются поиск и разработка новых подходов к оценке профиля безопасности ЛС, в т. ч. с использованием методов фармакоэпидемиологических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Глаголев С.В., Горелов К.В., Чижова Д.А. Развитие системы фармаконадзора в Российской Федерации. *Вестник Росздравнадзора*. 2019;(2):72–77. [Glagolev S.V., Gorelov K.V., Chizhova D.A. Razvitie sistemy farmakonadzora v Rossijskoj Federacii [Development of the pharmacovigilance system in the Russian Federation]. *Vestnik Roszdravnadzora [Bulletin of Roszdravnadzor]*. 2019;(2):72–77. (In Russian)].
2. Журавлева М.В., Романов Б.К., Городецкая Г.И., Муслимова О.В., Крысанова В.С., Демченкова Е.Ю. Актуальные вопросы безопасности лекарств

- венных средств, возможности совершенствования системы фармаконадзора. Безопасность и риск фармакотерапии. 2019;7(3):109–119. [Zhuravleva M.V., Romanov B.K., Gorodetskaya G.I., Muslimova O.V., Krysanova V.S., Demchenkova E. Yu. Aktual'nye voprosy bezopasnosti lekarstvennyh sredstv, vozmozhnosti sovershenstvovaniya sistemy farmakonadzora [Topical issues of drug safety, possibilities of improving of pharmacovigilance]. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii [Safety and risk of pharmacotherapy]*. 2019;7(3):109–119. (In Russian)]. DOI: 10.30895/2312-7821-2019-7-3-109-119.
3. Литвиненко Т.С., Сафроненко А.В., Ганцгорн Е.В., Дятчина Л.И., Замлелая И.В., Мякота И.М., Быстровский В.О. Нежелательные побочные реакции как актуальная проблема фундаментальной и клинической фармакологии. *Биомедицина*. 2020;16(3):115–119. [Litvinenko T.S., Safronenko A.V., Gantsgom E.V., Dyatchina L.I., Zamlelaya I.V., Myakota I.M., Bystrovskij V.O. Nezhelatel'nye pobochnye reakcii kak aktual'naya problema fundamental'noj i klinicheskoy farmakologii [Undesirable side reactions as an urgent problem of fundamental and clinical pharmacology]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(3):115–119. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-3-115-119.
4. Шубникова Е.В., Дармостукова М.А., Букагина Т.М., Каперко Д.А., Вельц Н.Ю., Казаков А.С., Снегирева И.И., Журавлева Е.О., Кутехова Г.В. О зарегистрированных в постмаркетинговый период нежелательных реакциях лекарственных средств. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2019;7(1):15–22. [Shubnikova E.V., Darmostukova M.A., Bukatina T.M., Kaperko D.A., Velts N.Yu., Kazakov A.S., Snegireva I.I., Zhuravleva E.O., Kutekhova G.V. O zaregistrirovannyh v postmarketingovyy period nezhelatel'nyh reakciyah lekarstvennyh sredstv [The adverse drug reactions registered during the postmarketing period]. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii [Safety and risk of pharmacotherapy]*. 2019;7(1):15–22. (In Russian)]. DOI: 10.30895/2312-7821-2019-7-1-15-2.
5. Ahern F., Sahm L.J., Lynch D., McCarthy S. Determining the frequency and preventability of adverse drug reaction-related admissions to an Irish University Hospital: A cross-sectional study. *Emerg. Med. J.* 2014;31(1):24–29. DOI: 10.1136/emered-2012-201945.
6. Akbari Sari A., Doshmangir L., Torabi F., Rashidian A., Sedaghat M., Ghomi R., Prasopa-Plaizier N. The incidence, nature and consequences of adverse events in Iranian hospitals. *Arch. Iran Med.* 2015;18(12): 811–815.
7. Bénard- Larivière A., Miremont- Salamé G., Pérault-Pochat M- C., Noize P., Haramburu F., EMIR Study Group on behalf of the French network of pharmacovigilance centres. Incidence of hospital admissions due to adverse drug reactions in France: The EMIR study. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2015;29:106–111. DOI: 10.1111/fcp.12088.
8. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/22589>
9. Leendertse A.J., Visser D., Egberts A.C.G., van den Bemt P.M.L.A. The relationship between study characteristics and the prevalence of medication-related hospitalizations: A literature review and novel analysis. *Drug Saf.* 2010;33(3):233–244. DOI: 10.2165/11319030-000000000-00000.
10. Pedrós C., Quintana B., Rebolledo M., Porta N., Vallano A., Arnau J.M. Prevalence, risk factors and main features of adverse drug reactions leading to hospital admission. *Eur. J. of Clin. Pharmacol.* 2014;70(3):361–367. DOI: 10.1007/s00228-013-1630-5.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Литвиненко Татьяна Сергеевна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: ts.litvinenko@gmail.com

Сафроненко Андрей Владимирович, д.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: andrejsaf@mail.ru

Макляков Юрий Степанович, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: maklus005@gmail.com

Tatyana S. Litvinenko, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: ts.litvinenko@gmail.com

Andrey V. Safronenko, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: andrejsaf@mail.ru

Yuri S. Maklyakov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: maklus005@gmail.com

Ганцгорн Елена Владимировна*, к.м.н., доц.,
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный ме-
дицинский университет» Минздрава России;
e-mail: gantsgorn@inbox.ru

Elena V. Gantsgorn*, Cand. Sci. (Med.), Assoc.
Prof., Rostov State Medical University of the Mi-
nistry of Health Care of Russia;
e-mail: gantsgorn@inbox.ru

Постникова Елена Сергеевна, к.м.н., ФГБОУ
ВО «Ростовский государственный медицинский
университет» Минздрава России

Elena S. Postnikova, Cand. Sci. (Med.), Rostov
State Medical University of the Ministry of Health
Care of Russia

Гайсаев Магомед Омарович, ФГБОУ ВО
«Ростовский государственный медицинский
университет» Минздрава России

Magomed O. Gaisaev, Rostov State Medical
University of the Ministry of Health Care of Russia

Брижак Виктория Германовна, ФГБОУ ВО
«Ростовский государственный медицинский
университет» Минздрава России

Viktoriya G. Brizhak, Rostov State Medical
University of the Ministry of Health Care of Russia

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-46-51>



ХРОНИЧЕСКИЙ КОМПЕНСИРОВАННЫЙ ТОНЗИЛЛОФАРИНГИТ: КЛИНИКО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Е.К. Мелоян, А.В. Сафроненко, Е.В. Ганцгорн*, В.И. Полякова, С.Д. Стагниева,
А.А. Ильина, Е.Ю. Романова

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России
344022, Российская Федерация, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

В статье представлены результаты комплексного клинико-микробиологического анализа с определением количественного и качественного состава «микробного пейзажа» глоточного лимфатического кольца, а также чувствительности к противомикробным лекарственным средствам у пациентов с хроническим компенсированным тонзиллофарингитом. Выявлено, что наиболее этиологически значимым микроорганизмом в развитии хронического компенсированного тонзиллофарингита является β -гемолитический стрептококк. Установлено, что популяции микроорганизмов, вегетирующих в глотке людей с хроническим компенсированным тонзиллофарингитом, демонстрируют высокую резистентность к антибактериальным и противогрибковым лекарственным средствам.

Ключевые слова: хронический компенсированный тонзиллофарингит, микробиоценоз глотки, лекарственная резистентность

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Мелоян Е.К., Сафроненко А.В., Ганцгорн Е.В., Полякова В.И., Стагниева С.Д., Ильина А.А., Романова Е.Ю. Хронический компенсированный тонзиллофарингит: клинико-микробиологические особенности. *Биомедицина*. 2022;18(2):46–51. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-46-51>

Поступила 20.03.2022

Принята после доработки 25.04.2022

Опубликована 10.06.2022

CHRONIC COMPENSATED TONSILLOPHARINGITIS: CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL FEATURES

Elena K. Meloyan, Andrey V. Safronenko, Elena V. Gantsgorn*, Viktoriya I. Polyakova,
Stanislav D. Stagniev, Alisa A. Ilyina, Ekaterina Yu. Romanova

Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don, Nakhichevsky Lane, 29

The article presents the results of a complex clinical and bacteriological study aimed at determining the quantitative and qualitative composition of the microflora of the pharyngeal lymphatic ring in patients with chronic compensated tonsillopharyngitis, including identification of microorganisms followed by determination of their sensitivity toward antibacterial and antimycotic drugs. β -hemolytic streptococcus was revealed to be the most etiologically significant microorganism in the development of chronic compensated tonsillopharyngitis. In addition, populations of microorganisms growing in the throat of such patients were found to exhibit high resistance toward antibacterial and antifungal drugs.

Keywords: chronic compensated tonsillopharyngitis, pharyngeal microbiocenosis, drug resistance

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

For citation: Meloyan E.K., Safronenko A.V., Gantsgorn E.V., Polyakova V.I., Stagniev S.D., Ilyina A.A., Romanova E.Yu. Chronic Compensated Tonsillopharyngitis: Clinical and Microbiological Features. *Journal Biomed.* 2022;18(2):46–51. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-46-51>

Submitted 20.03.2022

Revised 25.04.2022

Published 10.06.2022

Введение

Тонзиллофарингиты являются одной из наиболее распространённых форм гнойно-воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей (ВДП). Социальная значимость данной патологии определяется не только её широким распространением, но и высокой частотой развития различных осложнений [1].

Хронический тонзиллофарингит (ХТФ) представляет собой стойкое хроническое воспаление слизистой оболочки глотки, нёбных миндалин, характеризующееся рецидивирующими обострениями в виде ангины и общей токсико-аллергической реакцией. В общей структуре заболеваемости удельный вес тонзиллофарингитов достигает от 2,8 до 3%, и до 75% пациентов составляют лица до 30-ти лет [1].

Основным этиологическим фактором развития ХТФ общепризнан бактериальный, при этом доминируют представители рода *Streptococcus*. По данным многих отечественных и зарубежных авторов, β-гемолитический стрептококк группы А — *Str. pyogenes* (БГСА), встречается у пациентов различных возрастных групп примерно в 10–30% случаев [2, 4]. Немалая роль в развитии ХТФ принадлежит сапрофитным и условно-патогенным микроорганизмам (*Str. viridans*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*). В зависимости от стадии и выраженности воспалительного процесса состав микрофлоры в нёбных миндалинах может заметно меняться. Так, в стадии ремиссии доля БГСА снижается и начинают преобладать микоплазмы, энтеробактерии и стафилококки.

Успех лечения ХТФ во многом определяется рациональностью использования антибактериальных средств (АБС). Детальная информация о составе бактериальной флоры и степени её чувствительности к АБС позволяет подобрать эффективную терапию, сократить сроки лечения и предотвратить возможную хронизацию процесса [3].

Несмотря на необходимость учёта общности анатомо-физиологической структуры всех образований, входящих в состав глоточного лимфатического кольца, данных о комплексном исследовании состава его микробиоценозов в литературе недостаточно, что и определило целесообразность проведения настоящего исследования.

Цель работы — комплексное клинико-микробиологическое исследование пациентов с хроническим компенсированным тонзиллофарингитом (ХКТФ).

Материалы и методы

Клинико-микробиологическое исследование проведено с участием 30-ти условно здоровых людей без признаков воспалительного процесса в ротоглотке (группа 1, контрольная) и 60-ти больных (30 мужчин и 30 женщин) с ХКТФ (группа 2). Средний возраст, представленный в виде Ме (Q1–Q3), в среднем по выборке составил 37,0 (18,0–53,5) года.

Исследование было выполнено на базе лечебно-диагностического центра «Альянс 2000», оториноларингологического отделения № 1 для взрослых МБУЗ ГБ № 1 им. Н.А. Семашко (г. Ростов-на-Дону), лаборатории санитарной микробиологии вод-

ных объектов и микробной экологии человека ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора.

Для пациентов обеих групп был выполнен комплекс клинико-бактериологических методов исследования: сбор жалоб и анамнез заболевания (для группы 2), оториноларингологический осмотр, детальный анализ микрофлоры глотки.

Бактериологическое исследование состава микробиоценозов глотки проводилось в соответствии с приказом МЗ СССР № 535 от 1985 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Забор материала осуществляли натошак. Материалом для исследования служили мазки со слизистой оболочки глотки, которые забирали стерильным стандартным ватным тампоном, строго соблюдая последовательность: правая небная миндалина, правая задняя небная дужка, левая задняя небная дужка, левая небная миндалина, задняя стенка глотки. Микробиологическое исследование проводили в первые 2 ч после его забора. Материал исследовали путём посева на плотные питательные среды, используя метод «тампон-штрих». Чувствительность микробов к АБС и антимикотическим лекарственным средствам (ЛС) определяли диск-функциональным методом.

Статистическую обработку полученных данных проводили на ПК с использованием общепринятых методов описательной статистики и непараметрических методов посредством пакета статистических программ Statistica 10.0 («Statsoft Inc.», США). Проверка на нормальность распределения данных выполнялась с помощью критерия Колмогорова – Смирнова с поправкой Лиллиефорса.

Результаты и их обсуждение

Все пациенты с ХКТФ (группа 2) предъявляли широкий спектр жалоб как общего,

так и местного характера. Основными жалобами являлись: повторные ангины (2–3 раза в год, как правило, в холодное время года, с различной тяжестью течения заболевания), сопровождающиеся утратой трудоспособности не менее одного раза в год, неприятный запах изо рта, чувство дискомфорта и боли в глотке, увеличение шейных и зачелюстных лимфоузлов. Среди жалоб общего характера преобладали: наличие слабости, быстрой утомляемости, недомогания, снижения работоспособности, периодическое, в основном в вечернее время, повышение температуры тела до 37,2–37,4°C. Многие из больных (33 чел., 55%) отмечали нарушение настроения, раздражительность. У отдельных больных (9 чел., 15%) были жалобы на периодические боли в сердце, особенно в период обострения, которые не сопровождались изменениями на ЭКГ, боли в суставах. При детальном опросе большинство обследованных (41 чел., 68,3%) отмечали нарушение стула, чему особого значения не придавали; у некоторых обследованных женщин выявлялось нарушение менструального цикла.

При оториноларингологическом осмотре пациентов группы 2 были отмечены: спаянность небных миндалин с небными дужками, гиперемия, инфильтрация медиальных отделов небных дужек, наличие в лакунах небных миндалин казеозно-гнойных масс, реже — жидкого гноя.

В ходе проведённого исследования состава «микробного пейзажа» плоточного лимфатического кольца в группах 1 и 2 были получены следующие данные: в обеих группах были обнаружены представители как резидентной (постоянной) микрофлоры — α -гемолитические и негемолитические стрептококки, коагулазоотрицательные стафилококки, коринеформные бактерии и нейссерии, так и транзитной микрофлоры — β -гемолитические стрептококки, золотистые стафилококки, грибы рода *Candida*. Однако в количественном

соотношении видовой состав микробиоценозов обеих групп различался значительно: у условно здоровых людей по частоте обнаружения преобладали α -гемолитические стрептококки (80%) и коагулазоотрицательные стафилококки (68%), а у больных с ХКТФ — β -гемолитические стрептококки (67,6%) и грибы рода *Candida* (48,3%).

Для характеристики положения отдельных видов микроорганизмов в составе микробиоценоза глоточного лимфатического кольца использовали показатель постоянства (С), в зависимости от значений которого в структуре микробиоценоза различают постоянные виды (С=50% и более), добавочные (С=25–50%) и случайные (С<25%). Анализ количественного состава микробиоценозов небных миндалин, небных дужек, задней стенки глотки больных ХКТФ показал, что β -гемолитические стрептококки чаще других видов микроорганизмов присутствовали в большом количестве. В 80,4% случаев их количество в составе микробной популяции составляло выше 106. Высокая концентрация в микробном очаге была также характерна для α -гемолитических стрептококков (64,1% случаев), коринеформных бактерий (66,7%) и псевдомонад (50%). В то же время стафилококки, как золотистые, так и коагулазоотрицательные, определялись, в основном, в количестве 104–105 и 106 (50 и 48,8% случаев соответственно), также как и грибы рода *Candida*, степень обсеменённости большинства из которых составила 104–105 (39,5% случаев).

Сочетание высокого показателя постоянства (С) и высокой степени концентрации в составе микробиоценоза β -гемолитических стрептококков позволило считать их этиологически значимым микроорганизмом. Увеличение содержания в составе микробиоценоза до 106 и выше таких микроорганизмов, как α -гемолитические стрептококки, негемолитические стрептококки, коринеформные бактерии, могло свидетельствовать об определённой степени участия этих

представителей резидентной микрофлоры в патогенезе ХКТФ, на что также указывает и нахождение в составе микробиоценоза ВДП даже в небольшой концентрации представителей случайной микрофлоры — золотистых стафилококков.

Что касается чувствительности микроорганизмов, то с учётом того, что микробиоценозы ротоглотки больных ХКТФ представлены в большинстве своём ассоциациями микроорганизмов, мы сочли необходимым сравнить данные чувствительности к ЛС монокультур и ассоциаций микроорганизмов, выделенных из глотки людей с ХКТФ. Было проведено сравнительное изучение чувствительности к десяти АБС (имипенем, гентамицин, цефтриаксон, цефалотин, амоксициллин, левофлоксацин, доксициклин, цефотаксим, эритромицин, азитромицин) всей популяции вегетирующих в микробиоценозе микроорганизмов и чувствительности к тем же антибиотикам чистых культур, присутствующих в данных ассоциациях. В результате для двухкомпонентных ассоциаций совпадение чувствительности наблюдалось в 36,67% случаев от всех случаев определения чувствительности двухкомпонентных ассоциаций, для трёхкомпонентных — 25,71%, для четырёхкомпонентных — 16,15% совпадений от случаев определения чувствительности трёх- и четырёхкомпонентных ассоциаций соответственно. Среди всех изученных популяций микроорганизмов наибольшая чувствительность выявлялась к имипенему, наименьшая — к эритромицину, доксициклину, азитромицину. При этом множественную устойчивость проявляли 57,14% ассоциаций микроорганизмов. Из них 34,4% были резистентны к четырём АБС, 25% — к трём, 21,9% — к шести и более.

Чувствительность штаммов грибов рода *Candida* была оценена в отношении шести антимикотических ЛС (амфотерицин В, флуконазол, кетоконазол, интраконазол, клотримазол, нистатин). Среди культур

грибов рода *Candida*, аналогично бактериальным ассоциациям, преобладали устойчивые формы, среди них в 52,3% случаев была выявлена устойчивость к 3–4 антимикотическим ЛС.

Выводы

Принимая во внимание, что α -гемолитическим и негемолитическим стрептококкам принадлежит наиболее существенная роль в обеспечении колонизационной резистентности ВДП, с учётом полученных нами данных можно считать, что у людей с ХКТФ имеет место нарушение этой системы.

Популяции микроорганизмов, вегетирующих в глотке людей с ХКТФ, демон-

стрируют высокую резистентность к антибактериальным и противогрибковым ЛС. При этом в 70,9% случаев чувствительность всей микробной популяции не соответствовала чувствительности отдельных ассоциантов. Чувствительность всей популяции микроорганизмов изменялась соответственно количеству входящих в неё ассоциантов: чем больше ассоциантов входило в состав популяции, тем реже наблюдалось совпадение результатов чувствительности.

Полученные данные целесообразно учитывать при разработке новых фармакотерапевтических подходов к лечению ХКТФ и проведении комплексной клинико-фармакологической оценки их эффективности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Пальчун В.Т., Гуров А.В., Гусева О.А. Патогенетические особенности формирования хронической тонзиллярной патологии. *Вестник оториноларингологии*. 2018;83(2):30–33. [Pal'chun V.T., Gurov A.V., Guseva O.A. Patogeneticheskie osobennosti formirovaniya hronicheskoy tonsillyarnoy patologii [The specific pathogenetic features of the development of chronic tonsillar pathology]. *Vestnik otorinolaringologii [Bulletin of otorhinolaryngology]*. 2018;83(2):30–33. (In Russian)]. DOI: 10.17116/otorino201883230-33.
2. Цыркунов В.М., Рыбак Н.А., Васильев А.В., Рыбак Р.Ф. Микробиологические и морфологические аспекты хронического тонзиллита. *Инфекционные болезни*. 2016;14(1):42–47. [Tsyrcunov V.M., Rybak N.A., Vasilev A.V., Rybak R.F. Mikrobiologicheskie i morfologicheskie aspekty hronicheskogo tonsillita [Microbiological and morphological aspects of chronic tonsillitis]. *Infeksionnyye bolezni [Infectious disease]*. 2016;14(1):42–47. (In Russian)]. DOI: 10.20953/1729-9225-2016-1-42-47.
3. Haidara A., Sidibé Y., Samaké D., Coulibaly A., Touré M., Coulibaly B. Tonsillitis and their complications: Epidemiological, clinical and therapeutic profiles. *Int. J. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg*. 2019;8(3):98–105. DOI: 10.4236/ijohns.2019.83011.
4. Quintero B., Araque M., van der Gaast-de Jongh C., Escalona F., Correa M., Morillo-Puente S., Vielma S., Hermans P.W.M. Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* colonization in healthy Venezuelan children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2011;30(1):7–19. DOI: 10.1007/s10096-010-1044-6.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мелоян Елена Константиновна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: nmeloyan@yandex.com

Elena K. Meloyan, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: nmeloyan@yandex.com

Сафроненко Андрей Владимирович, д.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: andrejsaf@mail.ru

Andrey V. Safronenko, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: andrejsaf@mail.ru

Ганцгорн Елена Владимировна*, к.м.н., доц.,
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: gantsgorn@inbox.ru

Elena V. Gantsgorn*, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: gantsgorn@inbox.ru

Полякова Виктория Игоревна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России

Viktoriya I. Polyakova, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia

Стагниева Станислав Дмитриевич, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России

Stanislav D. Stagniev, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia

Ильина Алиса Александровна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России

Alisa A. Ilyina, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia

Романова Екатерина Юрьевна, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России

Ekaterina Yu. Romanova, Rostov State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ИНСУЛИНА НА Na^+/K^+ -АТФАЗУ И КОМПОНЕНТЫ Ca^{2+} -ТРАНСПОРТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ В КАРДИОМИОЦИТАХ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА

И.Б. Сухов*, О.В. Чистякова

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

В условиях сахарного диабета 1-го типа (СД1) часто развиваются тяжёлые формы сердечно-сосудистой патологии. Для коррекции функций сердечно-сосудистой системы могут быть использованы подходы, ослабляющие провоспалительные и антиапоптотические сигналы вовлечённых в патологическую гипертрофию кардиомиоцитов и повышающие активность кардиопротекторных путей в них. Поскольку при СД1 ослабляется инсулиновая система мозга, вовлечённая в контроль сердечно-сосудистой системы и функций кардиомиоцитов, то одним из таких подходов является применение интраназально вводимого инсулина (ИВИ). Целью работы было изучить влияние ИВИ на экспрессию генов, кодирующих компоненты инсулиновой системы и Ca^{2+} -транспортирующей системы, а также активность Na^+/K^+ -АТФазы в кардиомиоцитах крыс со стрептозотоциновым СД1. ИВИ устранял возникающее при СД1 разобщение молекулярных механизмов, участвующих в электромеханическом сопряжении в кардиомиоцитах крыс. Это указывает на перспективность дальнейших исследований ИВИ как препарата, потенциально способного восстанавливать функции миокарда при СД1.

Ключевые слова: сердце, сахарный диабет, диабетическая кардиомиопатия, Na^+/K^+ -АТФаза, интраназально введённый инсулин, крыса

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: средства государственного бюджета Минобрнауки России по госзаданию 075-00886-20-01 (направление АААА-А18-118012290427) с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

Благодарности: авторы выражают благодарность профессору МГУ Ольге Сергеевне Тарасовой за обсуждение идей статьи.

Для цитирования: Сухов И.Б., Чистякова О.В. Влияние интраназально вводимого инсулина на Na^+/K^+ -АТФазу и компоненты Ca^{2+} -транспортирующей системы в кардиомиоцитах у крыс с сахарным диабетом 1-го типа. *Биомедицина*. 2022;18(2):52–62. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-52-62>

Поступила 07.04.2022

Принята после доработки 22.04.2022

Опубликована 10.06.2022

IMPACT OF INTRANASAL INSULIN ADMINISTRATION ON Na^+/K^+ -ATPASE AND Ca^{2+} -TRANSPORTING SYSTEM COMPONENTS IN RAT CARDIOMYOCYTES WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Ivan B. Sukhov*, Oksana V. Chistyakova

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

Cardiovascular pathology is the main cause of morbidity among patients with diabetes mellitus. The development of a specific therapy aimed at either blunting the protein signals involved in pathological cardiomyocyte hypertrophy or upregulating the expression of cardioprotective pathways can support new strategies for treating diabetes-induced cardiac dysfunctions. The aim of the work was to study the impact of intranasal insulin administration (IIA) on the expression of genes encoding insulin-dependent signaling proteins and components of the Ca^{2+} -transporting system, as well as on the activity of Na^+/K^+ -ATPase in cardiomyocytes on the model of experimental type 1 diabetes mellitus (DM1) in rats. It was shown that IIA eliminates the uncoupling of molecular mechanisms involved in electromechanical coupling in rat cardiomyocytes that occurs under the conditions of mild DM1. This allowed us to recommend IIA as a therapeutic approach to the prevention and treatment of structural and functional myocardial disorders caused by diabetes.

Keywords: heart, diabetes mellitus, diabetic cardiomyopathy, Na^+/K^+ -ATPase, intranasally administered insulin, rat

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

Funding: State budget funds of the Ministry of Science and Higher Education assignment No. 075-00886-20-01 (direction AAAA-A18-118012290427) using the equipment of the Center for Collective Use of the IEPHB RAS.

Acknowledgment: The authors express their appreciation to Olga Sergeevna Tarasova, Prof. of Moscow State University, for discussing the ideas presented in the article.

For citation: Sukhov I.B., Chistyakova O.V. Impact of Intranasal Insulin Administration On Na^+/K^+ -ATPase and Ca^{2+} -Transporting System Components in Rat Cardiomyocytes with Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal Biomed.* 2022;18(2):52–62. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-52-62>

Submitted 07.04.2022

Revised 22.04.2022

Published 10.06.2022

Введение

Сердечно-сосудистая патология является основной причиной заболеваемости среди пациентов с сахарным диабетом 1-го (СД1) и 2-го типов. Патофизиология диабетического повреждения сердца сложна и многофакторна и включает метаболические нарушения, такие как сбой доставки и утилизации глюкозы кардиомиоцитами; повышенное окисление свободных жирных кислот, блокирующее окислительное фосфорилирование продуктов обмена глюкозы

и подавляющее гликолиз; а также аномалии кальциевого обмена и нарушения чувствительности миофибрилл кардиомиоцитов к Ca^{2+} , что становится причиной внутриклеточной перегрузки Ca^{2+} и приводит к нарушению расслабления миокарда [7]. В процесс сопряжения возбуждения и сокращения миокарда вовлечён целый комплекс белков, регулирующих уровень внутриклеточного Ca^{2+} . Саркоплазматическая Ca^{2+} -АТФаза (SERCA), кодируемая специфичным для миокарда геном *Atp2a2*,

выводит Ca^{2+} из цитозоля, способствуя расслаблению кардиомиоцитов. К основным элементам регуляции кальциевой динамики в клетке относят рианодиновые рецепторы RyR , которые, будучи гомотетрамерами, располагаются на мембране саркоплазматического ретикулума и представляют особый тип хемоактивируемых Ca^{2+} -каналов. Специфичными для миокарда являются RyR2 , активация (открытие) которых и, соответственно, высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума происходит даже при небольшом повышении концентрации Ca^{2+} в цитоплазме кардиомиоцита. Одними из ранних механизмов сердечной патологии могут являться структурно-функциональная перестройка в T-системе кардиомиоцитов, представляющей инвагинацию плазматической мембраны t-трубочек внутрь миоцита. Изоформа Na^+/K^+ -АТФазы (КФ 3.6.3.9), содержащая $\alpha 2$ -субъединицу, представлена на мембране кардиомиоцита в t-трубочках с большей плотностью, где контролирует градиент ионов Na^+ , что косвенно влияет на работу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника, регулирующего концентрацию цитоплазматического Ca^{2+} и сократимость кардиомиоцитов [3, 15]. С другой стороны, потеря инотропного эффекта в диабетическом миокарде вызвана изменениями в механизмах трансдукции сигнала, включающих гормональные рецепторы и депрессии при фосфорилировании различных мембранных и внутриклеточных белков.

В настоящее время ведётся разработка фармакологических подходов, направленных либо на ослабление сигналов, вовлечённых в патологическую гипертрофию кардиомиоцитов, либо на усиление кардиопротекторных путей, в частности на инсулин-зависимый путь фосфатидилинозитол-3-киназы (ФИЗ-К)/протеинкиназы Б (Akt).

Цель работы — изучить влияние 10-дневного интраназального введения ин-

сулина (ИВИ) на экспрессию генов, кодирующих инсулин-зависимые сигнальные белки и элементы Ca^{2+} -транспортирующей системы, а также на активность Na^+/K^+ -АТФазы в кардиомиоцитах крыс в условиях стрептозотоцинового СД1.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Эксперименты проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с подопытными животными», утверждёнными этическим комитетом ИЭФБ РАН, и согласно требованиям Директивы Европейского парламента (1986 г.). СД1 индуцировали у самцов крыс Wistar в возрасте 2,5 мес. внутривенной инъекцией стрептозотина (СТЗ) («Sigma», США) в дозе 35 мг/кг, вторую инъекцию проводили через 15 дней после первой в дозе 30 мг/кг (группа СД1, n=7). Контрольным животным вводили 0,1 М цитратный буфер (pH 4,5) (группа К, n=7). Через 1,5 мес. после второй инъекции СТЗ и на протяжении последующих 10 дней часть животных получала ИВИ в дозе 0,5 МЕ на крысу (группа СД1+Инс, n=7). Уровень глюкозы при контроле развития СД1 и в конце эксперимента (через 10 недель после первого введения СТЗ) измеряли натощак в крови, взятой из хвостовой вены, используя тест-полоски One Touch Ultra (США) и глюкометр Life Scan («Johnson&Johnson», Дания). Уровень гликированного гемоглобина (HbA1C) в крови определяли в конце эксперимента с помощью набора A1CNow+ Professional («Polymer Technology Systems», США). Уровень инсулина измеряли в конце эксперимента в сыворотке крови методом твердофазного ИФА с помощью набора Rat Insulin ELISA («Merckodia AB», Швеция). Крыс содержали в виварии по 5 особей в клетке, при 12/12 ч режиме дня, со свободным доступом к пище и воде, и выводили из эксперимента декапитацией после обезболивания путём в/б введения хлоралгидрата (400 мг/кг).

Определение уровня экспрессии генов

Для проведения количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, совмещённой с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), тотальную РНК выделяли из тканей сердца с помощью коммерческого набора «Реагент ExtractRNA» («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Готовые образцы РНК тестировали в 2%-ном агарозном геле для контроля наличия чётко различимых пятен, соответствующих рибосомальной РНК 18S и 28S, что свидетельствует об отсутствии деградации препаратов РНК. Далее образец, содержащий 1 мг РНК, обратно транскрибировали с помощью коммерческого набора MMLV RT («Евроген», Россия), используя Random Primer 10 в соответствии с протоколом производителя. Предварительно все образцы РНК обрабатывали DNase I, RNase-free («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) для очистки препарата от содержащихся в нём молекул ДНК. ПЦР амплификацию проводили в среде (объём 25 мкл), содержащей 10 нг продукта ОТ-ПЦР, 0,4 мкМ прямого и обратного праймера, и реагент qPCRMix-HS SYBR+LowROX («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Амплификационный сигнал детектировали с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System («Life Technologies» (ABI), «Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Для проведения ПЦР использовали температурный режим: (1) предварительная денатурация при 95°C в течение 5 мин; (2) трёхэтапная амплификация и количественный анализ, содержащий 38 циклов: 95°C в течение 30 с, температура отжига (подбиралась индивидуально) в течение 30 с, и 72°C — в течение 30 с; (3) кривая плавления: 95°C в течение 15 с, 60°C — в течение 1 мин, разогрев образца до 95°C с детекцией каждый 1% времени нагрева, выдерживание в течение 30 с, охлаждение до 60°C в течение 15 с. Анализ кривой

плавления показал наличие одного пика и отсутствие димеров праймеров в каждой реакции, содержащий образец. Время отжига рассчитывали с помощью онлайн-программы Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). В предварительных исследованиях продукты ПЦР тестировали в 2%-ном агарозном геле для контроля получения ампликона соответствующего размера.

Определение Na^+/K^+ -АТФазной активности

АТФазную активность определяли в микросомальной фракции мембран кардиомиоцитов, выделенных из левых желудочков сердец методом дифференциального центрифугирования [5]. При определении общей АТФазной активности пробы, содержащие 40–45 мкг белка, инкубировали 10 мин при 37°C в среде: 20 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 3 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭГТА, 1 мМ Na_2ATP [5]. Na^+/K^+ -АТФазную активность оценивали по содержанию неорганического фосфата по методу Фиске – Суббароу. Na^+/K^+ -АТФазную активность рассчитывали, вычитая из общей АТФазной активности Mg^{2+} -зависимую, определяемую в присутствии 1 мМ уабаина — специфического ингибитора α -изоформ Na^+/K^+ -АТФазы.

Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили с помощью программ «GraphPad Prism 7 software» («GraphPad Software», США), по методу ANOVA с post hoc тестом Тьюки для параметрических данных и тестом Данна для непараметрических. Параметрические данные представлены в виде $M \pm S.E.M.$, непараметрические — с указанием медианы и 25%/75% перцентилей. Корреляции по Пирсону (для параметрических данных) и Спирману (для непараметрических данных) считали высокой степени при $r > 0,7$. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Таблица. Метаболические и биохимические показатели экспериментальных животных ($M \pm S.E.M.$)
Table. Metabolic and biochemical parameters of experimental animals

Группа	Масса, г			Глюкоза, ммоль/л	Инсулин, нг/мл	HbA _{1c} , %
	до введения СТЗ	через 10 недель после введения СТЗ	прирост массы			
Контроль	221±5	307±5	86,4±3,3	5,6±0,1	1,3±0,1	4,2±0,2
СД1	220±7	285±8	65,3±6,5*	12,2±0,9*	0,8±0,2*	6,1±0,6
СД1+Инс	226±8	307±14	81,3±6,7	8,8±1,0*	1,0±0,1	6,3±0,5

Примечание: * — статистически значимые различия данных в сравнении с группой Контроль при $p < 0,05$.
Note: * — statistically significant differences compared to the control group at $p < 0.05$.

Результаты исследований

Метаболические и биохимические показатели у экспериментальных животных

У диабетических крыс прирост массы тела был в 1,3 раза ниже по сравнению с контрольной группой ($p=0,03$), а животные, получавшие ИВИ, по массе не отличались от контрольных ($p=0,76$) (табл.). В конце эксперимента (на 75-й день) у всех диабетических крыс наблюдалась гипергликемия (табл.). Уровень инсулина в крови интактных диабетических животных был ниже в ~1,5 раза по сравнению

с контрольной группой ($p=0,03$), а ИВИ полностью его восстанавливало ($p=0,184$). Содержание гликированного гемоглобина в крови у животных всех исследованных групп не различалось.

Определение активности Na^+/K^+ -АТФазы и уровня экспрессии гена *Atp1a2*

В миокарде диабетических крыс выявлено значительное возрастание активности Na^+/K^+ -АТФазы по сравнению с контрольными животными (рис. 1), при этом уровень экспрессии гена *Atp1a2*, кодирующего $\alpha 2$ -субъединицу Na^+/K^+ -АТФазы,

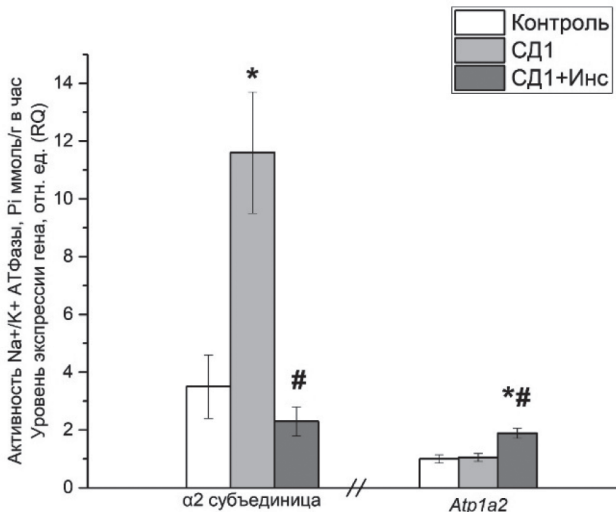


Рис. 1. Уровень активности и экспрессии гена $\alpha 2$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы ($M \pm S.E.M.$).

Примечание: * — данные имеют статистически значимые различия при $p < 0,05$ в сравнении с группой Контроль; # — данные имеют статистически значимые различия при $p < 0,05$ в сравнении с группой СД1.

Fig. 1. Level of activity and expression of the $\alpha 2$ subunit of Na^+/K^+ -ATPase gene ($M \pm S.E.M.$).

Note: * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group. # - statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the DM1 group.

не менялся. При ИВИ у диабетических животных активность Na^+/K^+ -АТФазы снижалась до контрольных значений, а уровень экспрессии *Atp1a2* возрастал, превышая значения у интактных животных в 1,6–1,7 раза. Корреляционный анализ данных экспрессии гена *Atp1a2* и генов ключевых компонентов инсулинового сигнального пути в кардиомиоцитах левого желудочка крыс выявил определённые закономерности. Так, в группе СД1 между уровнем экспрессии генов *Atp1a2* и *Akt* выявлена высокая степень отрицательной корреляции ($r=-0,92$; $p=0,025$), которая, на первый взгляд, неочевидна, т. к. уровень экспрессии *Atp1a2* при СД не менялся. Важно отметить, что после ИВИ экспрессия двух генов стимулируется, но выявленная при диабете отрицательная корреляция пропадает.

Оценка уровня экспрессии генов, кодирующих инсулинзависимые сигнальные белки и элементы Ca^{2+} -транспортирующей системы в кардиомиоцитах крыс

В левом желудочке диабетических крыс уровень экспрессии гена *Insr*, кодирующего рецептор инсулина, возрастал почти в два раза по сравнению с контрольными животными ($p=0,0374$), и это соотношение сохранялось после ИВИ (рис. 2). Уровень экспрессии гена *Akt*, кодирующего ПКБ, при диабете снижался на 25% ($p=0,0056$) (рис. 2), а ИВИ стимулировало экспрессию гена до значений выше контрольных больше чем на 30% ($p=0,004$). Характерной особенностью диабетических животных являлась высокая степень отрицательной корреляции между уровнем экспрессии генов *Insr* и *Akt* ($r=-0,965$; $p=0,035$). Экспрессия гена

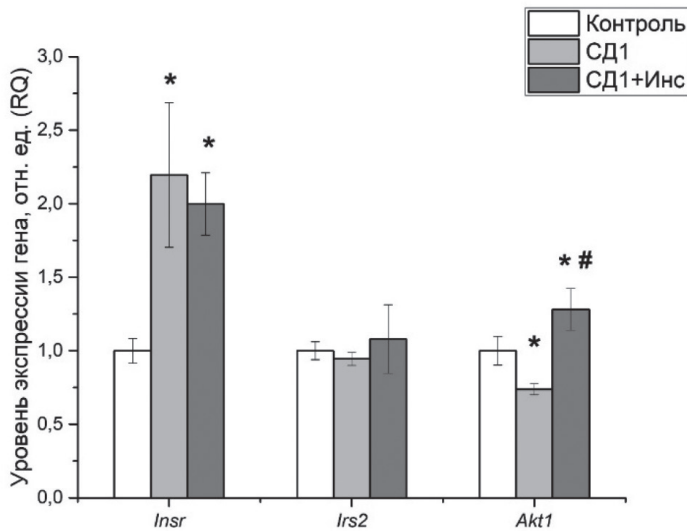


Рис. 2. Уровень экспрессии генов ключевых компонентов инсулинового сигнального пути в кардиомиоцитах левого желудочка крыс ($M \pm S.E.M$).

Примечание: * — данные имеют статистически значимые различия при $p < 0,05$ в сравнении с группой Контроль; # — данные имеют статистически значимые различия при $p < 0,05$ в сравнении с группой СД1.

Fig. 2. Gene expression level for the key components of the insulin signaling pathway in rat left ventricular cardiomyocytes ($M \pm S.E.M$).

Note: * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group. # - statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the DM1 group.

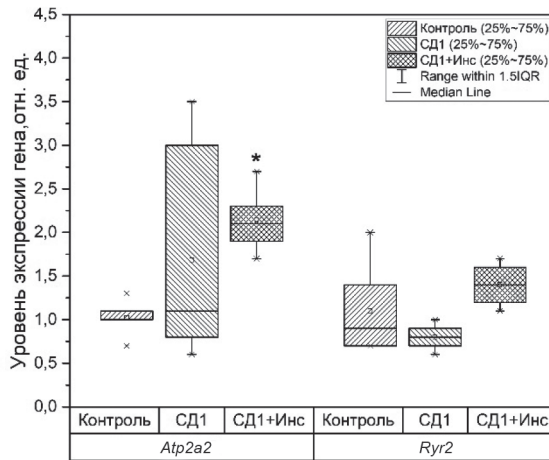


Рис. 3. Уровень экспрессии генов, кодирующих компоненты Ca^{2+} -транспортирующей системы.

Примечание: данные представлены с указанием медианы (median line) и 25%/75% перцентилей. * — данные имеют статистически значимые различия при $p < 0,05$ в сравнении с группой Контроль.

Fig. 3. Expression level of genes encoding Ca^{2+} -transporting system components.

Note: the data are presented with the median line and 25%/75% percentiles. * — statistically significant differences at $p < 0.05$ compared to the control group.

Irs2 не различалась у контрольных и диабетических животных и не изменялась после ИВИ (рис. 2).

Оценка уровня экспрессии гена *Atp2a2*, кодирующего саркоплазматическую Ca^{2+} АТФазу (SERCA) в сердце у диабетических крыс, выявила ненормальный характер распределения данного параметра. После ИВИ экспрессия *Atp2a2* возросла приблизительно в два раза по сравнению с контролем. Экспрессия гена *Ryr2*, кодирующего риадиноновый рецептор, во всех экспериментальных группах не различалась (рис. 3).

Обсуждение результатов

Анализ метаболических и биохимических показателей показал, что после повторного введения средних доз СТЗ у крыс развился мягкий СД1, что следует из снижения массы тела, частичной (снижение на 38%) инсулиновой недостаточности и сохранения нормального уровня $HbA1C$. Таким образом, кардиомиоциты диабетических крыс продолжительное время функционируют

в условиях умеренного дефицита инсулина в кровотоке при умеренной гипергликемии.

Как показали результаты работы, в миокарде крыс в условиях мягкого СД1 ключевые компоненты инсулиновой сигнальной системы на уровне экспрессии генов претерпевают компенсаторные изменения. Выявленное в миокарде диабетических крыс увеличение экспрессии гена *Insr* можно оценивать как компенсаторный ответ на снижение стимуляции рецепторов инсулина (снижение уровня инсулина в кровотоке), который сохраняется и после ИВИ. В целом, пролонгированное, в течение 10 дней, ИВИ оказало нормализующее действие на состояние крыс с мягко выраженным СД1. Для понимая вероятных причин такого влияния стоит отметить более ранние работы. Так, при введении инсулина экспериментальным животным путём инъекции в желудочки головного мозга было обнаружено действие гормона на периферические ткани, в частности печень. Этот эффект объяснялся влиянием гормона в аркуатных ядрах гипоталамуса на АТФ-

зависимые K^+ -каналы [19]. Ингибирование этих каналов путём нокаута субъединицы SUR1, равно как и хирургическая перерезка печёночной ветви X черепно-мозгового нерва (*nervus vagus*), полностью снимало центральное действие инсулина, что приводит к снижению в два раза поглощения глюкозы тканями и доказывает центральное влияние инсулина на активность *n. vagus*. В случае же интраназального введения инсулин обнаруживается в достаточной концентрации в структурах головного мозга, в частности в гипоталамусе, а также в крови, печени и почках [14]. Это даёт основание предполагать стимуляцию *n. vagus* при ИВИ крысам и в нашей работе.

К настоящему времени накоплены данные, что стимуляция *n. vagus* оказывает протекторное влияние на сердце [16]. Так, в работах [10, 18] показано, что длительное протекторное влияние ацетилхолина на сердце могут опосредовать М3-холинорецепторы. Вероятно, такое влияние можно называть трофическим, что впервые описано в работах Л.А. Орбели, как адаптационно-трофическое влияние вегетативной нервной системы. В ряде работ говорится о неспецифическом влиянии стимуляции *n. vagus* на сердце, в частности через уменьшение продукции провоспалительных цитокинов [2, 17]. Центральное влияние инсулина на активность *n. vagus* показано как *in vivo* [13], так и *in vitro* [4]. Ранее мы также показали, что ИВИ нормализует активность аденилатциклазной сигнальной системы в миокарде и тканях репродуктивной системы самок крыс с СД 2-го типа [22, 23]. Стоит отметить особенность модели и методов изучения Na^+/K^+ -АТФазы в представленной работе. Ранее мы показали, что при остром СД1 у крыс в условиях 5-кратного увеличения уровня глюкозы и 2,5-кратного увеличения уровня гликозилированного гемоглобина (при введении высоких доз СТЗ) функциональная активность Na^+/K^+ -АТФазы в сердечной мышце у крыс

подавляется [1]. В данной работе условия создания модели СД1 позволили оценить эффекты, непосредственно связанные с инсулиновым дефицитом, исключив негативное влияние гипергликемии, а также нарушения жирового обмена, провоспалительных цитокинов и др. негативные факторы некомпенсированного СД1.

Обсуждая реализацию эффекта ИВИ в кардиомиоцитах на молекулярном уровне, стоит отметить, что ранее показано регулирующее действие инсулина на Na^+/K^+ -АТФазу в сердце [6, 11, 21]. В данной работе мы показали, что изменение на уровне экспрессии генов ключевых компонентов инсулиновой сигнальной системы и снижение уровня периферического инсулина при СД1 приводят к увеличению количества комплексов Na^+/K^+ -АТФазы на плазматической мембране кардиомиоцитов, содержащих $\alpha 2$ -субъединицу. Согласно данным литературы, в условиях гипергликемии в кардиомиоцитах происходит перераспределение $\alpha 2$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы между эндоплазматическим пулом, где запасаются компоненты Na^+/K^+ -АТФазы, и плазматической мембраной [25]. Также показано, что инсулин регулирует это перераспределение, стимулируя транслокацию $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -субъединиц фермента в плазматическую мембрану через ФИ-3-киназный путь, а в условиях СД транслокация изоформы $\alpha 2$ оказывается более уязвимой к снижению инсулинового сигнала [21]. Аналогичный эффект — возрастание активности Na^+/K^+ -АТФазы — у диабетических крыс также выявлен в других тканях, в частности в печени и в почках [12]. Увеличение как $\alpha 1$, так и $\alpha 2$ Na^+/K^+ -АТФазы показано в кардиомиоцитах крысы и в условиях 9-недельной диеты с водой, содержащей 10% фруктозы [20].

Полученные нами данные позволяют заключить, что ПКБ/Akt, опосредующая действие ФИ-3-К, оказывает ингибирующее действие на перераспределение $\alpha 2$ -субъединиц и их синтез *de novo*. Уве-

личение же на плазматической мембране более чем в три раза количества комплексов Na^+/K^+ -АТФазы, содержащих $\alpha 2$ -субъединицу, может приводить к нарушению работы t-трубочек, поскольку в них имеет предпочтительную локализацию именно $\alpha 2$ [8, 9]. Вероятно, это может существенно влиять на обмен ионов Ca^{2+} и негативно регулировать сокращение кардиомиоцитов, поскольку экспрессия генов Ca^{2+} АТФазы эндоплазматического ретикулума (SERCA), как и рианодиновых каналов, при СД1 не менялась.

На физиологическом уровне ИВИ нормализует уровень инсулина в периферической крови, что в совокупности с возможным центральным влиянием инсулина на активность *n. vagus* (см. выше) нормализует активность Na^+/K^+ -АТФазы. Это указывает на снижение до нормальных значений количества комплексов Na^+/K^+ -АТФазы на плазматической мембране кардиомиоцитов, содержащих $\alpha 2$ -субъединицу. Поскольку Na^+/K^+ -АТФаза электрогенна, мы предполагаем, что возвращение её количества до контрольных значений стабилизирует работу t-трубочек. Также при ИВИ возрастает уровень экспрессии как гена $\alpha 2$ -субъединицы, так и генов *Akt* и *SERCA*, что можно связать с усилением инсулинового сигнала. По литературным данным, подкожное лечение инсулином диабетических животных в течение двух недель приводит к увеличению в несколько раз уровня экспрессии гена $\alpha 2$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, при пониженном уровне белка $\alpha 2$ -субъединицы в сравнении

с контролем [24], что согласуется с нашими данными. Поскольку $\alpha 2$ -субъединица Na^+/K^+ -АТФазы имеет предпочтительную локализацию в t-трубочках [8, 9], снижение её экспрессии может существенно влиять на обмен ионов Ca^{2+} , препятствуя работе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника. Это, в свою очередь, оказывает действие на сокращения кардиомиоцитов через локальные субклеточные механизмы, что может быть причиной развития кардиомиопатии.

Выводы

1. ИВИ устраняет разобщение молекулярных механизмов, участвующих в электромеханическом сопряжении в кардиомиоцитах крыс при экспериментальном СД1.
2. ИВИ нормализует уровень инсулина в крови крыс при экспериментальном СД1, что наряду с возможным центральным влиянием инсулина на активность *n. vagus* нормализует активность Na^+/K^+ -АТФазы в кардиомиоцитах.
3. Снижение уровня экспрессии $\alpha 2$ -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы в кардиомиоцитах при СД1 может препятствовать работе $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника и являться причиной развития диабетической кардиомиопатии.
4. Протеинкиназа Б (Akt), опосредующая действие ФИ-3-К, оказывает ингибирующее действие на перераспределение $\alpha 2$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы и их синтез *de novo*.
5. ИВИ можно рекомендовать в качестве терапевтического подхода к профилактике и лечению вызванных диабетом нарушений миокарда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Чистякова О.В., Сухов И.Б., Добрецов М.Г., Кубасов И.В. Изучение активности Na^+/K^+ -атфазы в миокарде крыс в экспериментальных условиях преддиабета и сахарного диабета. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2020;56(2):166–168. [Chistyakova O.V., Sukhov I.B., Dobretsov M.G., Kubasov I.V. Izuchenie aktivnosti Na^+/K^+ -atfazy v miokarde kry' s v e'ksperimental'ny'x usloviyax prediabetes i saxarnogo diabeta [The study of rat myocardial Na^+/K^+ -ATPase activity in experimental conditions of prediabetes and diabetes mellitus]. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii [Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology]*. 2020;56(2):166–168. (In Russian)]. DOI: 10.31857/S0044452920020047.
2. Andersson U., Tracey K.J. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.*

- 2012;30:313–335. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075015.
3. Berry R.G., Despa S., Fuller W., Bers D.M., Shattock M.J. Differential distribution and regulation of mouse cardiac Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits in T-tubule and surface sarcolemmal membranes. *Cardiovasc. Res.* 2007;73(1):92–100. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.11.006
 4. Blake C.B., Smith B.N. Insulin reduces excitation in gastric-related neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2012;303(8):R807–R814. DOI: 10.1152/ajp-regu.00276.2012.
 5. Bublitz M. (ed.). *P-type ATPases: Methods and protocols, methods in molecular biology*. New York: Springer Science+Business Media, 2016;1377.
 6. Chibalin A.V. Regulation of the Na_2K -ATPase: Special implications for cardiovascular complications of metabolic syndrome. *Pathophysiology.* 2007;14(3–4):153–158. DOI: 10.1016/j.pathophys.2007.09.004.
 7. Dallak M., Al-Ani B., Abdel Kader D.H., Eid R.A., Haidara M.A. Insulin suppresses type 1 diabetes mellitus-induced ventricular cardiomyocyte damage associated with the inhibition of biomarkers of inflammation and oxidative stress in rats. *Pharmacology.* 2019;104(3–4):157–165. DOI: 10.1159/000500898.
 8. Despa S., Bers D.M. Functional analysis of Na/K -ATPase isoform distribution in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007;293(1):C321–C327. DOI: 10.1152/ajpcell.00597.2006.
 9. Despa S., Lingrel J.B., Bers D.M. $\text{Na}(+)/\text{K}(+)$ -ATPase $\alpha 2$ -isoform preferentially modulates Ca^{2+} transients and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 2012;95(4):480–486. DOI: 10.1093/cvr/cvs213.
 10. Hang P., Zhao J., Qi J., Wang Y., Wu J., Du Z. Novel insights into the pervasive role of M(3) muscarinic receptor in cardiac diseases. *Curr. Drug Targets.* 2013;14(3):372–377.
 11. Hansen P.S., Buhagiar K.A., Gray D.F., Rasmussen H.H. Voltage-dependent stimulation of the $\text{Na}(+)/\text{K}(+)$ pump by insulin in rabbit cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2000;278(3):C546–C553. DOI: 10.1152/ajpcell.2000.278.3.C546.
 12. Iannello S., Milazzo P., Belfiore F. Animal and human tissue Na , K -ATPase in obesity and diabetes: A new proposed enzyme regulation. *Am. J. Med. Sci.* 2007;333(1):1–9. DOI: 10.1097/00000441-200701000-00001.
 13. Krowicki Z.K., Nathan N.A., Hornby P.J. Gastric motor and cardiovascular effects of insulin in dorsal vagal complex of the rat. *Am. J. Physiol.* 1998;275(5):G964–G972. DOI: 10.1152/ajpgi.1998.275.5.G964.
 14. Lochhead J.J., Thorne R.G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012;64(7):614–628. DOI: 10.1016/j.addr.2011.11.002.
 15. Louch W.E., Sejersted O.M., Swift F. There goes the neighborhood: Pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca^{2+} handling. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010;2010:503906. DOI: 10.1155/2010/503906.
 16. Machhada A., Hosford P.S., Dyson A., Ackland G.L., Mastitskaya S., Gourine A.V. Optogenetic stimulation of vagal efferent activity preserves left ventricular function in experimental heart failure. *JACC Basic Transl. Sci.* 2020;5(8):799–810. DOI: 10.1016/j.jacpts.2020.06.002.
 17. Olofsson P.S., Rosas-Ballina M., Levine Y.A., Tracey K.J. Rethinking inflammation: Neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol. Rev.* 2012;248(1):188–204. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01138.x.
 18. Pan Z., Guo Y., Qi H., Fan K., Wang S., Zhao H., Fan Y., Xie J., Guo F., Hou Y., Wang N., Huo R., Zhang Y., Liu Y., Du Z. M3 subtype of muscarinic acetylcholine receptor promotes cardioprotection via the suppression of miR-376b-5p. *PLoS One.* 2012;7(3):e32571. DOI: 10.1371/journal.pone.0032571.
 19. Pocai A., Lam T.K., Gutierrez-Juarez R., Obici S., Schwartz G.J., Bryan J., Aguilar-Bryan L., Rossetti L. Hypothalamic $\text{K}(\text{ATP})$ channels control hepatic glucose production. *Nature.* 2005;434(7036):1026–1031. DOI: 10.1038/nature03439.
 20. Romic S., Djordjevic A., Tepavcevic S., Culafic T., Stojiljkovic M., Bursac B., Stanisic J., Kostic M., Gligorovska L., Koricanac G. Effects of a fructose-rich diet and chronic stress on insulin signaling and regulation of glycogen synthase kinase-3 beta and the sodium-potassium pump in the hearts of male rats. *Food Funct.* 2020;11(2):1455–1466. DOI: 10.1039/c9fo02306b.
 21. Rosta K., Tulassay E., Enzsoly A., Ronai K., Szantho A., Pandics T., Fekete A., Mandl P., Ver A. Insulin induced translocation of Na^+/K^+ -ATPase is decreased in the heart of streptozotocin diabetic rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 2009;30(12):1616–1624. DOI: 10.1038/aps.2009.162.
 22. Shpakov A.O., Derkach K.V., Chistyakova O.V., Moiseyuk I.V., Sukhov I.B., Bondareva V.M. Effect of intranasal insulin and serotonin on functional activity of the adenylyl cyclase system in myocardium, ovary, and uterus of rats with prolonged neonatal model of diabetes mellitus. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2013;49(2):153–164. DOI: 10.1134/S0022093013020047.
 23. Shpakov A.O., Chistyakova O.V., Derkach K.V., Moiseyuk I.V., Bondareva V.M. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes. *Central Eur. J. Biol.* 2012;7(1):33–47. DOI: 10.2478/s11535-011-0089-6.
 24. Ver A., Szántó I., Bányász T., Csermely P., Végh E., Somogyi J. Changes in the expression of Na^+/K^+ -ATPase isoenzymes in the left ventricle of diabetic rat hearts: effect of insulin treatment.

Diabetologia. 1997;40(11):1255–1262. DOI: 10.1007/s001250050818.

25. Yan X., Xun M., Dou X., Wu L., Han Y., Zheng J. Regulation of Na⁺-K⁺-ATPase effected high glu-

cose-induced myocardial cell injury through c-Src dependent NADPH oxidase/ROS pathway. *Exp. Cell Res.* 2017;357(2):243–251. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.05.023.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Сухов Иван Борисович*, к.б.н., ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН;
e-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Ivan B. Sukhov*, Cand. Sci. (Biol.), Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Чистякова Оксана Викторовна, к.б.н., ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН;
e-mail: chiosana@yandex.ru

Oksana V. Chistyakova, Cand. Sci. (Biol.), Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: chiosana@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИНЪЕКЦИОННЫХ ИМПЛАНТАТОВ НА ОСНОВЕ МИКРОЧАСТИЦ РАЗЛИЧНЫХ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ В МОДЕЛИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ У МЫШЕЙ

И.А. Демьяненко*, А.В. Шишкина, Ю.С. Хац, Н.В. Калмыкова

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России
123098, Российская Федерация, Москва, ул. Гамалеи, 18

Проведено сравнительное исследование двух коммерчески доступных инъекционных имплантатов на основе микрочастиц различных биodeградируемых материалов (гидроксиапатита кальция и стабилизированного коллагена) в модели подкожной имплантации у мышей. Показано, что в использованной экспериментальной модели оба имплантата эффективно замещали объём мягких тканей. Резорбция имплантатов сопровождалась умеренным хроническим воспалительным ответом. Имплантат на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция подвергся выраженному постинъекционному обводнению на 1-е сутки после введения, характеризовался более выраженной миграцией из точки инъекции и более ранним началом процесса замещения микрочастиц аутологичными волокнами коллагена, сопровождающего его биodeградацию. В свою очередь, имплантат на основе микрочастиц стабилизированного коллагена оказывал больший эффект лифтинга на кожу в месте введения, а также дольше сохранял эффект объёмной коррекции в течение 12 мес. эксперимента.

Ключевые слова: имплантат, дермальный филлер, аугментация, гидроксиапатит, коллаген

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Демьяненко И.А., Шишкина А.В., Хац Ю.С., Калмыкова Н.В. Сравнительное исследование инъекционных имплантатов на основе микрочастиц различных биodeградируемых материалов в модели подкожной имплантации у мышей. *Биомедицина*. 2022;18(2):63–76. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-63-76>

Поступила 10.02.2022

Принята после доработки 05.04.2022

Опубликована 10.06.2022

COMPARATIVE STUDY OF INJECTABLE IMPLANTS BASED ON MICROPARTICLES OF VARIOUS BIODEGRADABLE MATERIALS IN A MURINE MODEL OF SUBCUTANEOUS IMPLANTATION

Ilya A. Demyanenko*, Anna V. Shishkina, Yulia S. Hats, Nina V. Kalmykova

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary
Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya Str., 18

A comparative study of two commercially available injectable implants based on microparticles of various biodegradable materials (calcium hydroxyapatite and cross-linked collagen) was carried out using a murine model of subcutaneous implantation. The developed experimental model showed that both implants effectively replace the volume of soft tissues. Implant resorption was accompanied by a moderate chronic

inflammatory response. The implant based on calcium hydroxyapatite microparticles caused pronounced post-injection swelling at 1 day after administration and demonstrated a more pronounced migration from the injection point. For this implant, an earlier onset of the process of replacing microparticles with autologous collagen fibers, accompanying its biodegradation, was observed. The implant based on cross-linked collagen microparticles had a greater lifting effect at the injection site and retained a longer effect of skin augmentation lasting for 12 months.

Keywords: implant, dermal filler, augmentation, hydroxyapatite, collagen

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

For citation: Demyanenko I.A., Shishkina A.V., Hats Y.S., Kalmykova N.V. Comparative Study of Injectable Implants Based on Microparticles of Various Biodegradable Materials in a Murine Model of Subcutaneous Implantation. *Journal Biomed.* 2022;18(2):63–76. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-63-76>

Submitted 10.02.2022

Revised 05.04.2022

Published 10.06.2022

Введение

Коррекция эстетических дефектов лица и тела, возникновение которых обусловлено возрастной или посттравматической потерей объёма мягких тканей, составляет значительную долю практики пластической хирургии и косметологии. Одним из наиболее распространённых методов восстановления утраченного объёма мягких тканей (аугментации) является проведение малоинвазивных процедур инъекционного введения т.н. «дермальных филлеров», представляющих собой вязкоупругие материалы, имплантируемые через иглу или канюлю шприца в корректируемый участок с целью придания ему дополнительного объёма [2, 19]. В настоящее время с данной целью широко применяются имплантаты на основе гелей, состоящих из стабилизированной (химически сшитой) гиалуроновой кислоты [7, 11]. Филлеры данного типа характеризуются хорошей биосовместимостью, а также отличным волюмизирующим действием. К их недостаткам относят часто возникающую гиперкоррекцию объёма тканей, вызванную избыточным набуханием геля гиалуроновой кислоты, а также низкую способность к стимуляции образования аутологичной соединительной ткани в области введения, замещающей утраченный

объём мягких тканей, в результате чего требуется проведение повторных процедур имплантации по мере биodeградации филлера.

Другим подходом к аугментации мягких тканей является введение инъекционных имплантатов, состоящих из микрочастиц биodeградируемого (гидроксиапатит кальция, коллаген, поли-L-молочная кислота), реже — небиodeградируемого (полиметилметакрилат) биосовместимого материала [4, 9]. Для оптимизации реологических свойств микрочастицы в составе таких филлеров могут быть диспергированы в гелевом носителе. Непосредственно после инъекционного введения данные имплантаты механически восстанавливают объём тканей. По мере биodeградации микрочастицы стимулируют формирование вокруг них плотной волокнистой соединительной ткани, которая обеспечивает пролонгированное восполнение объёма в области имплантации филлера.

Несмотря на коммерческую доступность значительного числа различных инъекционных имплантатов для аугментации мягких тканей, к настоящему времени опубликовано небольшое количество сравнительных исследований, посвящённых изучению эффективности и биологических свойств филлеров как на лаборатор-

ных животных, так и при клинических испытаниях. В то же время практикующим специалистам для выбора оптимальной стратегии коррекции эстетических дефектов у отдельного пациента необходимо понимание различий в динамике волюмизирующего действия имплантатов, а также характера локальной реакции тканей на его введение на различных сроках биodeградации.

Целью настоящей работы являлось сравнительное исследование характера волюмизирующего действия инъекционных имплантатов на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция и стабилизированного коллагена, а также тканевых реакций, сопровождающих их нахождение в тканях в модели подкожной имплантации у мышей.

Материалы и методы

Объект исследования

В качестве объектов исследования использовали биodeградируемые инъекционные имплантаты на основе микрочастиц, имеющие регистрационные удостоверения изделий медицинского назначения, выданные Росздравнадзором Российской Федерации.

Объектом испытания 1 (ГАП) являлся инъекционный имплантат, состоящий из сферических микрочастиц гидроксиапатита кальция, суспендированных в гелевом носителе из стерильной воды для инъекций, глицерина и карбоксиметилцеллюлозы натрия. Производитель: «Мерц Норт Америка, Инк.» (США), регистрационное удостоверение на медицинское изделие № ФСЗ 2010/07887. Коммерческое наименование: «Имплантат инъекционный «Радис» (Radiesse)».

Объектом испытания 2 (КОЛ) являлся инъекционный имплантат, состоящий из волокнистых микрочастиц коллагена, стабилизированного (сшитого)

водорастворимым карбодиимидом. Микрочастицы коллагена диспергированы в стерильном физ. р-ре хлорида натрия. Производитель: ООО «БиоФАРМАХОЛДИНГ» (Россия), регистрационное удостоверение на медицинское изделие № РЗН 2021/14722. Коммерческое наименование: «Имплантат инъекционный на основе коллагена COLLOST filler (КОЛЛОСТ филлер)».

Оба исследованных имплантата предупакованы в стерильные шприцы для инъекционного введения, имеют аналогичные показания к применению (проведение процедур аугментации мягких тканей) и метод имплантации (инъекционное подкожное или глубокое внутрикожное введение).

Выбор имплантатов для проведения эксперимента обусловлен различиями в составе, представляющими интерес с точки зрения сравнительного исследования, а также их популярностью среди пластических хирургов и косметологов.

Лабораторные животные

В работе использованы 60 самцов мышей линии BALB/c массой на момент начала исследования 25–31 г и возрастом 6 мес. Микробиологический статус животных — SPF. Источник получения: Научно-производственное подразделение ФИБХ РАН — питомник лабораторных животных «Пушино» (Московская обл.). Мышей содержали группами по 5 особей в клетках с площадью пола не менее 380 см² (тип Т2, «Tecniplast», Италия) на подстиле Lignocel («JRS», Германия) при контролируемых значениях температуры (20–26°C), влажности (30–70%), а также 12-часовом световом дне при искусственном освещении. Животные имели свободный неограниченный доступ к корму «Чара для содержания» («Ассортимент-агро», Россия) и стерильной деионизированной обратным осмосом воде. Все материалы, поступающие к животным, стерилизовали автоклавированием.

Обеспечение соблюдения принципов гуманного обращения с подопытными животными

Все планируемые манипуляции с подопытными животными, требования к условиям их кормления и содержания были оформлены в виде протокола (плана) исследования, который был одобрен комиссией по биоэтике. К работе с животными привлекались только обученные и квалифицированные сотрудники. Все манипуляции с животными были проведены только по процедурам, утверждённым в протоколе.

Схема эксперимента

В исследовании использовали модель подкожной инъекционной имплантации.

Перед началом эксперимента животных рандомизировали по массе тела. Мышей наркотизировали изофлураном, затем кожу и шерсть в местах введения образцов дезинфицировали антисептиком АХД 2000 («Лизоформ», Россия). Каждой мыши однократно вводили оба имплантата в две различные точки спины, расположенные симметрично от срединной линии тела, в объёме 250 мм³ на одну точку введения. Имплантацию проводили инъекционно через стерильные иглы калибра 26G. Мышей в равном количестве выводили из эксперимента путём ингаляционного воздействия углекислого газа через 1 сут., 1, 2, 3, 6 и 12 мес. после введения образцов (n=10 на временную точку). После проведения эвтаназии проводили забор тканей кожного лоскута в областях введения имплантатов для последующего макроскопического и гистологического исследования.

Макроскопическое исследование областей имплантации

Иссечённый кожный лоскут с имплантированным образцом подвергали цифровой макрофотосъёмке. На полученных фотоснимках качественно оценивали состояние окружающих тканей, форму и локализацию имплантата.

Для количественной оценки степени миграции материала имплантатов из точки инъекции, используя программное обеспечение ImageJ («НИН», США), на фотоснимках количественно определяли площадь распределения инъецированного материала в тканях кожного лоскута.

Для количественной характеристики волюмизирующего действия имплантатов:

1) определяли выраженность лифтинга кожи в областях инъекционного введения, измеряя максимальную толщину кожного лоскута штангенциркулем;

2) методом гидростатического взвешивания [10] определяли увеличение объёма мягких тканей кожного лоскута, вызванное введением имплантата. Для этого иссечённый кожный лоскут с имплантатом закрепляли на штативе при помощи серфина и проволоки, после чего погружали в расплавленный на весах сосуд с физ. р-ром (0,9% NaCl) так, чтобы образец не касался стенок сосуда. Массу вытесненной образцом жидкости определяли по показаниям весов (AJH-220, «Vibra», Япония) с точностью $\pm 0,001$ мл. Объём вытесненной жидкости, соответствующий объёму образца, рассчитывали исходя из известной плотности физ. р-ра (1,0046 кг/м³). Из полученного значения вычитали значение объёма тканей кожи, прилегающих к имплантату, рассчитанное по калибровочным кривым зависимости объёма кожи от её площади. Калибровочные кривые были построены по данным, полученным в предварительном эксперименте, в котором использовали участки кожи, полученные от интактных животных той же линии, пола и возраста, иссечённые из областей спины, соответствующих зонам имплантации исследуемых образцов (толщина кожи интактных мышей и животных с имплантированным материалом не различалась). Площадь кожного лоскута определяли фотопланиметрически при помощи программы ImageJ («НИН»),

США) на цифровых фотоснимках, полученных после иссечения образцов.

Гистологическое исследование областей имплантации

Для проведения гистологического исследования иссечённые кожные лоскуты с имплантированным материалом фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине. В связи с невозможностью получения гистологических срезов материала, содержащего твёрдые микрочастицы гидроксиапатита кальция, образцы предварительно подвергали декальцинации в 14%-ном р-ре ЭДТА в течение 30 сут. при комнатной температуре. Затем образцы обезвоживали и заливали в парафин по стандартной методике, после чего на ротационном микротоме RM2245 («Leica», Германия) готовили тонкие (3 мкм) гистологические срезы, которые монтировали на предметные стекла. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также трёхцветной окраской по Массону. Полученные препараты подвергали микроскопическому анализу с помощью микроскопа AxioScore A1 («Zeiss», Германия). Микрофотографии получали при помощи цветной цифровой камеры высокого разрешения MRc.5 («Zeiss», Германия).

Морфометрический анализ препаратов

Для количественной характеристики тканевых реакций, сопровождающих нахождение и биодegradацию имплантатов в тканях, проводили морфометрическое исследование полученных препаратов. Измерения проводили на микрофотографиях с помощью программ для анализа изображений AxioVision 3.0 («Zeiss», Германия) и ImageJ («NIH», США). В рамках морфометрического анализа определяли:

- *Объёмную плотность аутологических волокон коллагена в материале имплантата.* Трихромное окрашивание по методу Массона позволяет селективно выявлять на гистологических срезах аутологичные коллагеновые волокна за счёт их избира-

тельного окрашивания в синий цвет [7]. Основываясь на этом, в данном эксперименте на микрофотографиях гистологических препаратов, окрашенных по Массону, полученных на малом увеличении микроскопа (объектив 4×), подсчитывали долю площади имплантата, окрашенную в синий цвет. Для этого при помощи встроенных средств анализа программного обеспечения ImageJ выделяли область интереса, содержащую имплантированный материал, затем отфильтровывали все пиксели изображения, окрашенные в синий цвет, и определяли их суммарную площадь. Полученное значение относили к общей площади имплантата на срезе и выражали в процентах. Анализу подвергали всю суммарную площадь имплантата на трёх гистологических срезах одного образца.

- *Васкуляризацию материала имплантата, инфильтрацию нейтрофилами, гигантскими многоядерными клетками инородных тел (ГКИТ).* Анализ проводили полуколичественно (в баллах) на микрофотографиях гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, полученных с использованием объектива 40×. Исследовали по 10 произвольно выбранных полей зрения на трёх гистологических срезах одного образца. Полученные данные усредняли. Для оценки васкуляризации использовали следующую балльную систему оценки: 1 балл — 1–3 профили сосудов в поле зрения, 2 балла — 4–7 профилей сосудов в поле зрения, 3 балла — более 7 профилей сосудов в поле зрения, 4 балла — обширная полоса профилей сосудов, занимающая практически всё поле зрения. Для оценки инфильтрации клеточными формами (нейтрофилы, ГКИТ) применяли следующую балльную систему оценки: 1 балл — 1–5 клеток в поле зрения, 2 балла — 5–10 клеток в поле зрения, 3 балла — более 10 клеток в поле зрения, 4 балла — клетки образуют обильный инфильтрат, занимают практически всё поле зрения.

Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программного обеспечения Excel («Microsoft», США) и Prism («Graph Pad», США). Для первичного анализа рассчитывали показатели описательной статистики: среднее, стандартное отклонение. Проверку нормальности распределения осуществляли с использованием критерия Шапиро – Вилкса, гомоскедастичности — с использованием теста ранговой корреляции Спирмена. После этого данные подвергали двухфакторному дисперсионному анализу с последующими попарными сравнениями по Сидаку. Различия между экспериментальными группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Макроскопическое исследование

На первом этапе исследования качественно анализировали состояние имплантированного материала в тканях мышей. На 1-е сут. после введения имплантат на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция (ГАП) распределялся в тканях неравномерно, преимущественно тонким слоем (рис. 1). Наблюдалось сильное обводнение введённого материала, из-за чего при последующих манипуляциях, связанных с измерением объёма и помещением в гистологический фиксатор, он полностью терял структурную целостность и растекался. В связи с этим явилось невозможным проведение измерения его толщины, объёма, а также гистологического исследования на данном сроке. В свою очередь, имплантат на основе микрочастиц стабилизированного коллагена (КОЛ) выявлялся под кожей в виде единого скопления материала округлой или продолговатой формы (рис. 1). На более поздних временных точках эксперимента (1, 3, 6, 12 мес.) материал обоих имплантатов был покрыт тонкой соединительнотканной капсулой, в которой выявлялись сосуды, врастающие вглубь материала.

ГАП выявлялся под кожей преимущественно в виде вытянутых, неравномерно утолщённых «узловатых» тяжей (рис. 1), тогда как КОЛ сохранял округлую или слегка продолговатую форму на всех сроках эксперимента (рис. 1). Фотопланиметрическое исследование показало, что площадь распределения материала ГАП под кожей была в среднем более чем в 2 раза достоверно выше на 1-е сут. по сравнению с КОЛ, что отражает его более выраженную миграцию из точки инъекции. Данный характер различий между имплантатами сохранялся на последующих сроках 1–6 мес. В то же время на 12 мес. наблюдали противоположные статистически значимые отличия между образцами (табл. 1). Полученные данные явились отражением отличий в динамике изменения значений показателя между группами. Так, площадь материала КОЛ на протяжении всего эксперимента значительно не менялась, тогда как средняя площадь ГАП к 12 мес. уменьшилась примерно в 4 раза относительно исходной (табл. 1).

Далее оценивали способность имплантатов поддерживать толщину кожи (эффект лифтинга) в месте введения, а также их общее волюмизирующее действие. Максимальная толщина кожного лоскута в местах введения КОЛ была достоверно выше, нежели в группе ГАП на всех исследованных сроках (табл. 1). При этом в обеих группах происходило снижение среднего значения данного показателя в течение всего эксперимента (табл. 1). Измерение объёма методом гидростатического взвешивания показало, что средний волюмизирующий эффект обоих имплантатов через 1 мес. после введения более чем в 1,5 раза превосходил исходный объём инъектированных материалов (250 мм³). На последующих сроках значения объёма постепенно уменьшались (табл. 1). Волюмизирующее действие образцов КОЛ на 6 и 12 мес. статистически значимо превышало таковое у образцов ГАП (табл. 1), что явилось от-

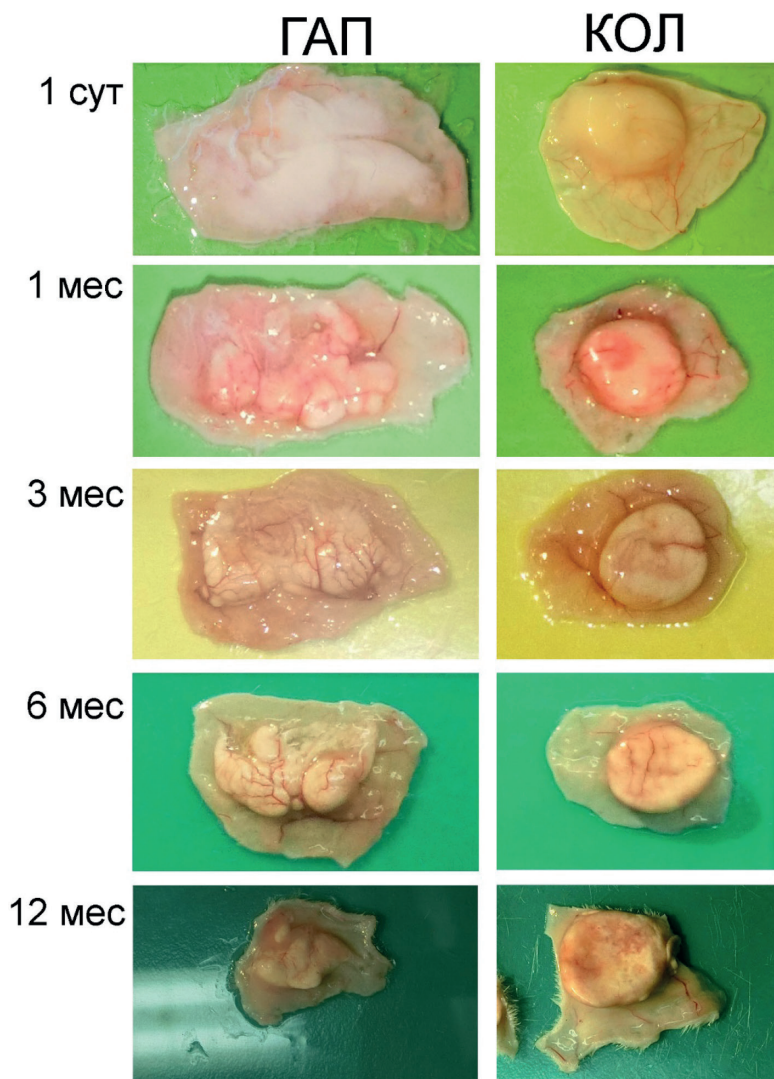


Рис. 1. Репрезентативные макрофотоснимки кожных лоскутов, иссечённых из области инъекционного введения имплантатов на основе микрочастиц гидроксипатита кальция (ГАП) и стабилизированного коллагена (КОЛ).
Fig. 1. Representative macrophotographs of skin flaps excised from the injection site of implants based on microparticles of calcium hydroxyapatite (HAP) and cross-linked collagen (COL).

ражением процесса менее выраженного сокращения измеряемого объёма в данной экспериментальной группе.

Гистологическое исследование

Для оценки тканевых реакций, сопровождающих имплантацию образцов, на следующем этапе работы проводили гистоло-

гическое исследование. Данные для группы ГАП на 1-е сут. эксперимента получены не были вследствие «растекания» значительно обводнённого материала имплантата. Образцы КОЛ на 1-е сут. после введения на гистологических срезах были представлены волокнистым базофильным материа-

Таблица 1. Количественные показатели, полученные при макроскопическом исследовании областей введения имплантатов на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция (ГАП) и стабилизированного коллагена (КОЛ). Данные представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение

Table 1. Quantitative results of a macroscopic study of the injection sites of implants based on calcium hydroxyapatite (HAP) and cross-linked collagen (COL) microparticles. Data are presented as the arithmetic mean ± standard deviation

Показатель	Имплантат	1 сут.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.
Площадь имплантата под кожей, мкм ²	ГАП	245±69	212±88	187±85	193±71	62±43
	КОЛ	92±27'	114±30'	100±62'	114±47'	117±34'
Толщина кожного лоскута в области имплантации, мм	ГАП	2,62±1,13	2,03±0,59	1,75±0,67	1,86±0,86	1,61±0,95
	КОЛ	4,26±0,79'	3,81±0,74'	3,65±1,57'	3,46±1,47'	2,82±0,98'
Увеличение объёма тканей, вызванное имплантатом, мм ³	ГАП	НД	392±145	218±85	133±40	82±109
	КОЛ	226±60	464±60	375±155	266±186'	213±88'

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с ГАП на том же экспериментальном сроке; НД — данные не были получены вследствие потери структурной целостности материала имплантата.

Note: * — $p < 0.05$ compared with HAP experimental group at the same time point; ND — no data were obtained due to the loss of structural integrity of the implant material.

лом, располагающимся под тканями кожного лоскута (рис. 2).

Волокна материала были разнонаправленны, окрашивались по Массону в красный цвет. На периферии введённого материала присутствовали клетки воспалительного инфильтрата, преимущественно нейтрофилы и небольшое число макрофагов. На сроке 1 мес. материал ГАП на срезах выявлялся в виде преимущественно округлых неокрашенных «пустот», соответствующих локализации сферических микрочастиц гидроксиапатита кальция до проведения декальцинации (рис. 2). Материал по периферии был покрыт коллагеновыми волокнами новообразованной соединительной ткани, проникающими в отдельных участках вглубь материала и оплетающими микрочастицы. Между микрочастицами обнаруживались многочисленные гигантские клетки инородных тел (ГКИТ), а также макрофаги. В толще материала между микрочастицами располагались кровеносные сосуды разного размера с эритроцитами в просвете. В свою очередь, образцы КОЛ на сроке 1 мес. также были покрыты новообразованной соединительной тканью, которая проникала в периферические отделы материала и оплетала его волокна. По периферии образцов на срезах

выявлялись макрофаги, единичные микрососуды и фибробласты. Вокруг отдельных волокон материала присутствовали ГКИТ. На последующих экспериментальных сроках (3, 6 и 12 мес.) как образцы ГАП, так и образцы КОЛ были окружены слоем плотно уложенных коллагеновых волокон с небольшим количеством фибробластов. Новообразованная соединительная ткань проникала между микрочастицами практически во всю толщу образцов обеих экспериментальных групп. На микрочастицах выявлялись многочисленные ГКИТ, а между ними — кровеносные сосуды различного размера. По мере увеличения срока после имплантации образцов на срезах визуально увеличивалась площадь, занимаемая новообразованными коллагеновыми волокнами, сопровождаемая сокращением количества непосредственно микрочастиц материала, что является следствием биodeградации имплантата с замещением микрочастиц новообразованной соединительной тканью (рис. 2).

Морфометрический анализ полученных гистологических препаратов показал, что начиная с 1 мес. происходило увеличение объёмной плотности новообразованных волокон коллагена в материале обоих имплантатов, достигающей величины

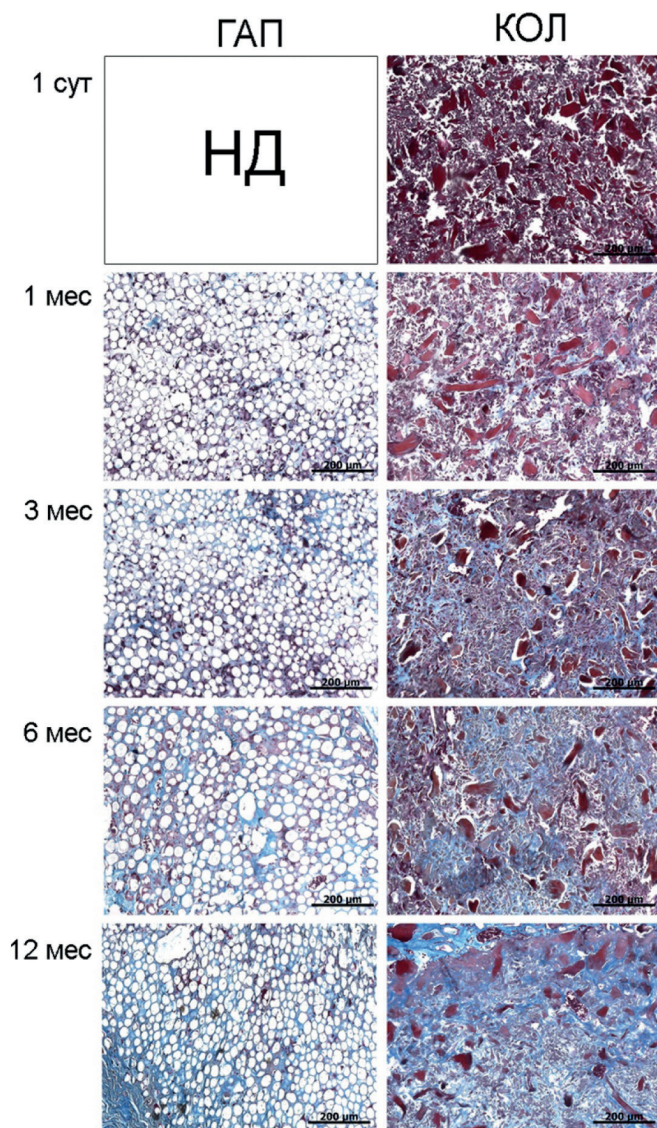


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии центральной области материала имплантатов на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция (ГАП) и стабилизированного коллагена (КОЛ) на поперечных гистологических срезах иссечённых кожных лоскутов. Трихромное окрашивание по Массону. Новообразованные аутологичные волокна коллагена окрашены в голубой цвет. Округлые неокрашенные области на микрофотографиях образцов ГАП соответствуют местам нахождения сферических микрочастиц до проведения декальцинации. Микрочастицы КОЛ окрашены в красный цвет. НД — данные не были получены вследствие потери структурной целостности материала имплантата.

Fig. 2. Representative microphotographs of the central region of the implants based on microparticles of calcium hydroxyapatite (HAP) and stabilized collagen (COL) on transverse histological sections of excised skin grafts. Masson's trichrome stain. The newly formed autologous collagen fibers are colored blue. Rounded uncolored areas in microphotographs of HAP samples correspond to the locations of spherical microparticles prior to decalcification. COL microparticles are colored red. ND — no data were obtained due to the loss of structural integrity of the implant material.

Таблица 2. Количественные и полуколичественные показатели, полученные при морфометрическом исследовании гистологических срезов имплантатов на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция (ГАП) и стабилизированного коллагена (КОЛ). Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение

Table 2. Quantitative and semi-quantitative results of a morphometric study of histological sections of implants based on microparticles of calcium hydroxyapatite (HAP) and cross-linked collagen (COL). Data are presented as the arithmetic mean \pm standard deviation

Показатель	Имплантат	1 сут.	1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.
Объёмная плотность аутологических волокон коллагена в имплантате, %	ГАП	НД	32,7 \pm 14,6	45,5 \pm 15,5	46,1 \pm 14,8	60,9 \pm 17,1
	КОЛ	0,0 \pm 0,0	11,2 \pm 5,8'	48,8 \pm 23,2	54,1 \pm 17,5	60,9 \pm 9,5
Васкуляризация имплантатов, средний балл	ГАП	НД	2,10 \pm 0,88	2,17 \pm 0,98	2,88 \pm 0,35	2,75 \pm 0,71
	КОЛ	0,00 \pm 0,00	0,89 \pm 0,33'	1,67 \pm 1,32	2,22 \pm 1,20	2,43 \pm 0,53
Инфильтрация имплантата нейтрофилами, средний балл	ГАП	НД	0,70 \pm 0,33	0,50 \pm 0,50	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
	КОЛ	1,50 \pm 0,53	1,00 \pm 0,50	0,67 \pm 0,37	0,44 \pm 0,24	0,00 \pm 0,00
Инфильтрация имплантата ГКИТ, средний балл	ГАП	НД	2,20 \pm 0,92	2,33 \pm 0,82	2,75 \pm 0,46	2,75 \pm 0,71
	КОЛ	0,00 \pm 0,00	0,44 \pm 0,24'	1,33 \pm 1,22	2,00 \pm 1,32	1,57 \pm 1,27

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с ГАП на том же экспериментальном сроке; НД — данные не были получены вследствие потери структурной целостности материала имплантата.

Note: * — $p < 0.05$ compared with HAP experimental group at the same time point; ND — no data were obtained due to the loss of structural integrity of the implant material.

в чуть более 60% к окончанию эксперимента (табл. 2). На сроке 1 мес. было выявлено более чем трёхкратное статистически значимое увеличение данного показателя в группе ГАП по сравнению с КОЛ. Однако к 3 мес. эксперимента различия между имплантатами по степени замещения имплантатованного материала аутологичным коллагеном на срезах нивелировались (табл. 2). Полуколичественная морфометрическая оценка васкуляризации имплантатов показала, что динамика изменения количества сосудов в образцах обеих экспериментальных групп напоминала динамику изменения объёмной плотности коллагена (табл. 2). Так, сосуды выявлялись в имплантированном материале, начиная с 1 мес., достигая наибольшего количества (2–3 балла) в интервале 6–12 мес. Средняя оценка васкуляризации ГАП через 1 мес. после введения была более чем в два раза выше по сравнению с КОЛ, различия были статистически значимы. На сроках 3–12 мес. отличия между группами выявлены не были.

Оценка клеточных реакций не выявила различий между имплантатами по величине нейтрофильной инфильтрации, характери-

зующей выраженность острого воспаления в области имплантации [5, 14]. Ожидаемо, она была наибольшей в острый период на 1-е сут. после введения (данные получены только для КОЛ), достигая средней величины в 1,5 балла по полуколичественной шкале оценки (табл. 2). На последующих сроках нейтрофильная инфильтрация была незначительна и не достигала средней величины в 1 балл, на сроке 12 мес. — полностью отсутствовала (табл. 2). Далее подсчитывали степень инфильтрации имплантатов ГКИТ, как показатель хронического воспалительного ответа [17, 21]. Полуколичественный анализ показал, что в материале ГАП средняя величина данного показателя варьировала между 2 и 3 баллами на сроках 1–12 мес. (табл. 2). В свою очередь, на сроке 1 мес. средняя оценка инфильтрации ГКИТ материала КОЛ была значительно (более чем в 4 раза) ниже, чем у ГАП. На последующих экспериментальных точках (3–12 мес.) средние значения данного показателя в группе КОЛ были также ниже, однако различия не достигали уровня статистической значимости (табл. 2).

Обсуждение результатов

Инъекционное введение имплантатов, структурной основой которых являются микрочастицы биосовместимых материалов, считается одним из достаточно распространённых способов проведения аугментации мягких тканей. В литературе применительно к подобным медицинским изделиям часто используют термин «стимуляторы коллагена» [1, 4, 8], подчёркивая тем самым их способность восстанавливать объём за счёт стимуляции формирования волокнистой соединительной ткани, основным компонентом которой являются пучки волокон коллагена. В настоящей работе исследовали популярные коммерчески доступные инъекционные имплантаты на основе микрочастиц биодegradируемых материалов различной химической природы — гидроксипатита кальция (ГАП) и коллагена, стабилизированного водорастворимым карбодиимидом (КОЛ). Гистологическое исследование подтвердило, что материал обоих имплантатов стимулировал образование аутологичной соединительной ткани, которая замещала его по мере биодegradации. При этом данный процесс на экспериментальном сроке 1 мес. происходил более интенсивно в имплантате ГАП. Вероятно, полученные данные отражают то, что инициация новообразования соединительной ткани в области введения ГАП происходила несколько раньше, нежели в КОЛ, что может быть обусловлено различиями в физико-химических свойствах материалов и/или структурой микрочастиц. Образование коллагена, как правило, сопровождается процессом формирования сосудов, обеспечивающих питание и газообмен формирующейся соединительной ткани [22]. Динамика васкуляризации имплантатов, выявленная в эксперименте, хорошо совпадала с динамикой замещения их материала аутологичным коллагеном.

Нахождение образцов в тканях не сопровождалось признаками острого воспаления,

за исключением срока 1 сут., что, очевидно, неспецифически обусловлено частичной травматизацией тканей, вызванной непосредственно процедурой имплантации. В то же время на последующих сроках имплантаты обоих типов характеризовались наличием умеренного хронического воспалительного ответа с присутствием ГКИТ, который в норме, как правило, сопровождает процесс биодegradации резорбируемых материалов [6, 21]. Ранее данное явление уже было описано для различных имплантатов на основе микрочастиц [3, 13, 16, 18]. Что интересно, характер различий между имплантатами на сроке 1 мес. по показателям объёмной плотности коллагена и васкуляризации совпадал с таковым по показателю инфильтрации ГКИТ (табл. 2). На основании этого мы предполагаем, что процесс стимуляции формирования аутологичной соединительной ткани под воздействием имплантатов на основе микрочастиц может быть обусловлен факторами, выделяемыми клетками воспалительного инфильтрата, осуществляющими резорбцию материала. Для проверки этой гипотезы требуются дальнейшие исследования.

Для количественной характеристики волонизирующего действия имплантатов измеряли их способность увеличивать толщину кожного лоскута, а также объём мягких тканей в месте инъекций. Было показано, что введение КОЛ эффективнее увеличивает толщину кожного лоскута по сравнению с ГАП на всех исследованных сроках. Сопоставление полученного результата со значениями показателя площади распределения материала под кожей (табл. 1), а также с качественными данными макроскопического исследования (рис. 1) позволяет заключить, что наблюдаемый эффект в основном обусловлен различной выраженностью постинъекционной миграции материала из точки введения. Так, материал КОЛ распределялся на значительно

меньшей площади, сохранял единую форму на протяжении всего периода испытаний, что позволило ему осуществлять более выраженный лифтинг кожи за счёт волномизации в районе точки введения. В то же время ГАП, мигрируя из зоны введения, располагался в тканях более тонким слоем, что физически ограничивало его способность к увеличению измеряемой максимальной толщины кожи.

Ранее измерение толщины кожного лоскута после инъекционного введения было предложено как один из показателей оценки эффективности действия дермальных филлеров *in vivo* на лабораторных животных [12]. Однако данный метод не оценивает непосредственно эффект объёмной коррекции, вызванный введением имплантата. В связи с этим для прямой оценки волномизирующего действия мы применили метод гидростатического взвешивания, который успешно применяется в другой экспериментальной модели [10]. Было выявлено, что наибольшее увеличение объёма тканей, вызванное введением имплантатов, наблюдалось на 1 мес. эксперимента. При этом значения данного показателя более чем в 1,5 раза превышали исходный объём имплантированных материалов (250 мм³). Наблюдаемый эффект может быть объяснён тем, что в значение измеряемой величины, помимо непосредственно объёма имплантированного материала, может вносить свой вклад и объём новообразованной соединительной ткани, формирующейся по его периферии на данном экспериментальном сроке. Также возможно, что механическое воздействие на окружающие ткани введённых инъекционных имплантатов стимулирует увеличение количества тканевой жидкости, оказывая таким образом влияние на измеряемый объём. На дальнейших точках (3–12 мес.) происходило снижение показателя объёмной коррекции в областях введения обоих имплантатов, что, вероятно, обусловлено биодеградацией введённых

материалов. Объём материала ГАП снижался быстрее в динамике эксперимента, нежели материал КОЛ. Выявленные различия могут быть обусловлены различной скоростью резорбции микрочастиц вследствие отличий в их химическом составе и структуре.

К сожалению, при анализе образцов, полученных на 1-е сут., после введения ГАП мы не смогли провести волнометрические измерения и гистологическое исследование, что было обусловлено сильным обводнением введённого материала. Данный имплантат, помимо микрочастиц гидроксиапатита кальция, содержит гелевый носитель на основе глицерина и карбоксиметилцеллюлозы. Мы предполагаем, что эффект избыточного набухания введённого материала, наблюдаемый в эксперименте, обусловлен притягиванием большого количества молекул воды из тканевой жидкости карбоксиметилцеллюлозой, являющейся полиэлектролитом. По мере рассасывания гелевого носителя отёчность введённых образцов пропадала на сроке 1 мес. В то же время обводнение материала ГАП на ранних сроках после введения, по-видимому, приводило к его менее равномерному распределению под кожей, нежели КОЛ, не содержащего в составе гелевый носитель. Что интересно, избыточный постинъекционный отёк области введения ранее был описан как одно из возможных нежелательных явлений при клиническом применении ГАП [15]. В связи с вышеизложенным, возможность набухания имплантата на ранних сроках после введения должна приниматься во внимание практикующими специалистами при проведении процедур с его использованием.

Настоящее исследование проведено на модели подкожной имплантации у мышей. Известно, что кожа лабораторных грызунов характеризуется высокой подвижностью относительно подлежащих тканей [23]. Кроме того, инъецированный под кожу

спины грызунов материал не подвергается значительным компрессионным деформациям. В связи с этим мы полагаем, что данные, полученные в проведенном эксперименте, будут наиболее релевантны и будут наилучшим образом отражать свойства имплантатов при их введении в области кожных покровов человека, обладающие сходными характеристиками, такие как зоны нижней трети лица (носогубные складки, «линии марионетки», «линии улыбки») и тыльная поверхность кистей рук [20].

Выводы

Результаты проведенного сравнительного исследования подтвердили способность имплантатов на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция и стабилизированного коллагена эффективно замещать объём мягких тканей как за счёт прямого аугментирующего действия введённого материала, так и за счёт стимуляции новообразова-

ния аутологичной соединительной ткани. Резорбция имплантатов сопровождалась умеренным хроническим воспалительным ответом, что характерно для биодegradуемых материалов. Имплантат на основе микрочастиц гидроксиапатита кальция подвергался выраженному постинъекционному обводнению на 1-е сут. после введения, что, вероятно, связано с наличием в его составе гелевого носителя, и распределялся подкожно на большей площади относительно точки введения. Также материал данного имплантата характеризовался более ранним началом процесса замещения микрочастиц аутологичными волокнами коллагена, сопровождающего его биодegradацию. В свою очередь, имплантат на основе микрочастиц стабилизированного коллагена оказывал больший эффект лифтинга кожи в месте введения, а также дольше сохранял эффект объёмной коррекции в течение 12 мес. эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Abuaf O.K., Yildiz H., Baloglu H, Bilgili M.E., Simsek H.A., Dogan B. Histologic evidence of new collagen formulation using platelet rich plasma in skin rejuvenation: A prospective controlled clinical study. *Ann. Dermatol.* 2016;28(6):718–724. DOI: 10.5021/ad.2016.28.6.718.
2. Ballin A.C., Brandt F.S., Cazzaniga A. Dermal fillers: An update. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2015;16(4):271–283. DOI: 10.1007/s40257-015-0135-7.
3. Berlin A.L., Hussain M., Goldberg D.J. Calcium hydroxylapatite filler for facial rejuvenation: A histologic and immunohistochemical analysis. *Dermatol. Surg.* 2008;34 Suppl 1:S64–S67. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2008.34245.x.
4. Breithaupt A., Fitzgerald R. Collagen stimulators: Poly-l-lactic acid and calcium hydroxyl apatite. *Facial. Plast. Surg. Clin. North. Am.* 2015;23(4):459–469. DOI: 10.1016/j.fsc.2015.07.007.
5. Broggin N., McManus L.M., Hermann J.S., Medina R., Schenk R.K., Buser D., Cochran D.L. Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface. *J. Dent. Res.* 2006;85(5):473–478. DOI: 10.1177/154405910608500515.
6. Chen H., Agrawal D.K., Thankam F.G. Biomaterials-driven sterile inflammation. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2022;28(1):22–34. DOI: 10.1089/ten.TEB.2020.0253.
7. Cheng L., Sun X., Tang M., Jin R., Cui W., Zhang Y. An update review on recent skin fillers. *Plast. Aesthet. Res.* 2016;3:92–99. DOI: 10.20517/2347-9264.2015.124.
8. de Melo F., Nicolau P., Piovano L., Lin S., Baptista-Fernandes T., King M., Camporese A., Hong K., Khattar M.M., Christen M. Recommendations for volume augmentation and rejuvenation of the face and hands with the new generation polycaprolactone-based collagen stimulator (Ellansé®). *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2017;10:431–440. DOI: 10.2147/CCID.S145195.
9. Eppley B., Dadvand B. Injectable soft-tissue fillers: Clinical overview. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006;118(4):E98–E106. DOI: 10.1097/01.prs.0000232436.91409.30.
10. Fereidoni M., Ahmadiani A., Semnianian S., Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2000;43(1):11–14. DOI: 10.1016/s1056-8719(00)00089-7.
11. Gold M.H. Use of hyaluronic acid fillers for the treatment of the aging face. *Clin. Interv. Aging.* 2007;2(3):369–376. DOI: 10.2147/cia.s1244.
12. Hee C.K., Shumate G.T., Narurkar V., Bernardin A., Messina D.J. Rheological properties and *in vivo* performance characteristics of soft tissue fillers. *Dermatol.*

- Surg.* 2015;41 Suppl 1:S373–S381. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000536.
13. Holzapfel A.M., Mangat D.S., Barron D.S. Soft-tissue augmentation with calcium hydroxylapatite: Histological analysis. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2008;10(5):335–338. DOI: 10.1001/archfaci.10.5.335.
 14. Jhunjhunwala S., Aresta-DaSilva S., Tang K., Alvarez D., Webber M.J., Tang B.C., Lavin D.M., Veiseh O., Doloff J.C., Bose S., Vegas A., Ma M., Sahay G., Chiu A., Bader A., Langan E., Siebert S., Li J., Greiner D.L., Newburger P.E., von Andrian U.H., Langer R., Anderson D.G. Neutrophil responses to sterile implant materials. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137550. DOI: 10.1371/journal.pone.0137550.
 15. Kadouch J.A. Calcium hydroxylapatite: A review on safety and complications. *J. Cosmet. Dermatol.* 2017;16(2):152–161. DOI: 10.1111/jocd.12326.
 16. Lemperle G., Morhenn V., Charrier U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast. Surg.* 2003;27(5):354–366. DOI: 10.1007/s00266-003-3022-1.
 17. Lucke S., Walschus U., Hoene A., Schnabelrauch M., Nebe J.B., Finke B., Schlosser M. The in vivo inflammatory and foreign body giant cell response against different poly(L-lactide-co-D/L-lactide) implants is primarily determined by material morphology rather than surface chemistry. *J. Biomed. Mater. Res.* 2018;106(10):2726–2734. DOI: 10.1002/jbm.a.36500.
 18. Marmur E.S., Phelps R., Goldberg D.J. Clinical, histologic and electron microscopic findings after injection of a calcium hydroxylapatite filler. *J. Cosmet. Laser Ther.* 2004;6(4):223–226. DOI: 10.1080/147641704100003048.
 19. Narins R.S., Bowman P.H. Injectable skin fillers. *Clin. Plast. Surg.* 2005;32(2):151–162. DOI: 10.1016/j.cps.2004.12.002.
 20. Pierre S., Liew S., Bernardin A. Basics of dermal filler rheology. *Dermatol. Surg.* 2015;41 Suppl 1:S120–S126. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000334.
 21. Sheikh Z., Brooks P.J., Barzilay O., Fine N., Glogauer M. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. *Materials (Basel).* 2015;8(9):5671–5701. DOI: 10.3390/ma8095269.
 22. Tonnesen M.G., Feng X., Clark R.A.F. Angiogenesis in wound healing. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2000;5(1):40–46. DOI: 10.1046/j.1087-0024.2000.00014.x.
 23. Wong V.W., Sorkin M., Glotzbach J.P., Longaker M.T., Gurtner G.C. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011;2011:969618. DOI: 10.1155/2011/969618.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Илья Александрович Демьяненко*, к.б.н., ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; [e-mail: ilya871@rambler.ru](mailto:ilya871@rambler.ru)

Анна Владимировна Шишкина, к.х.н., ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Юлия Самуиловна Хац, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Нина Владимировна Калмыкова, к.б.н., ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Ilya A. Demyanenko, Cand. Sci. (Biol.), National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia; [e-mail: ilya871@rambler.ru](mailto:ilya871@rambler.ru)

Anna V. Shishkina, Cand. Sci. (Chem.), National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia

Yulia S. Hats, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia

Nina V. Kalmykova, Cand. Sci. (Biol.), National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia

* 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

Уважаемые коллеги, авторы и читатели журнала «Биомедицина»!



25–26 мая 2022 года состоялась наша ежегодная научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование», посвященная юбилею доктора медицинских наук профессора В.Н. Каркищенко, на которой было представлено более 60 докладов в 8 секциях, включая секцию студентов. Конференция прошла в очном и заочном форматах. Мы благодарны коллегам из Ростова-на-Дону и Санкт-Петербурга за проведение секций в своих регионах, а также всем участникам Конференции.

Материалы, присланные для участия в заочном формате, размещены на официальном сайте НЦБМТ ФМБА России www.scbmt.ru. Наиболее яркие и актуальные работы будут опубликованы в ближайших выпусках журнала «Биомедицина».

