

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

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

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 18

2022

4



Уважаемые коллеги, дорогие друзья!



Сердечно поздравляем всех с Новым годом и Рождеством!

Традиционно подводя итоги, с удовлетворением отмечаем, что число наших авторов постоянно растет (по данным РИНЦ в 2021 году выросло с 104 до 234 человек относительно предыдущего года), удвоилось и число новых авторов. А еще наши авторы помолодели, теперь их средний возраст — 44,6 лет.

Выражаем огромную благодарность и признательность всем членам нашего редакционного совета за сотрудничество и многолетний труд и хотим представить читателям наших новых коллег, пополнивших ряды Редсовета:

- доктора биологических наук **Еримбетова** Кенеса Тагаевича (Боровск, Калужская обл.);
- доктора химических наук, профессора **Коваленко** Леонида Владимировича (Москва);
- доктора технических наук, профессора **Кузнецова** Александра Евгеньевича (Москва);
- доктора технических наук, профессора РАН **Мартиросьян** Владимира Викторовича (Москва);
- доктора биологических наук **Остренко** Константина Сергеевича (Боровск, Калужская обл.);
- доктора технических наук, профессора РАН **Федулову** Лилию Вячеславовну (Москва);
- доктора медицинских наук, профессора **Щастного** Анатолия Тадеушевича (Витебск, Республика Беларусь).

Приветствуем наших авторов, доверяющих нам свои работы и активно сотрудничающих с редакцией журнала. Благодарим коллег из издательства «Нэикон» за подготовку номеров журнала и полиграфические услуги.

В наступающем году редакция журнала планирует расширить тематику и отдавать предпочтение статьям по направлениям, связанным с биотехнологиями.

Мы с надеждой вступаем в очередной год и не меняем своих принципов: публикации статей остаются бесплатными для всех, все авторы безвозмездно получают экземпляр журнала со своей статьёй.

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

Всем друзьям нашего журнала желаем мира, здоровья и счастья!

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

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2022, Том 18, № 4

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. 4

БИОМЕДИЦИНА

Biomeditsina

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

■ Главный редактор

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

■ Заместители главного редактора

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

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н.

■ Ответственный секретарь

Алимкина Оксана Владимировна

■ Члены редакционного совета

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

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

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

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

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

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

Дубина Михаил Владимирович, д.м.н., акад. РАН (Москва, Россия)

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

Еримбетов Кенес Тагаевич, д.б.н. (Боровск, Калужская обл., Россия)

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

Коваленко Леонид Владимирович, д.х.н., проф. (Москва, Россия)

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

Кузнецов Александр Евгеньевич, д.т.н., проф. (Москва, Россия)

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

Мартиросян Владимир Викторович, д.т.н., проф. РАН (Москва, Россия)

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

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

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

Остренко Константин Сергеевич, д.б.н. (Боровск, Калужская обл., Россия)

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

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

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

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

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

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

Сычёв Дмитрий Алексеевич, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)

Федулова Лилия Вячеславовна, д.т.н., проф. РАН (Москва, Россия)

Хритинин Дмитрий Фёдорович, д.м.н., проф., акад. РАН (Москва, Россия)

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

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

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

Щастный Анатолий Тадеушевич, д.м.н., проф. (Витебск, Республика Беларусь)

БИОМЕДИЦИНА

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 «Издательство «Триада». 170034, Тверская область, Тверь, пр. Чайковского, 9, оф. 514 |
| Дата выхода в свет: | 10.12.2022 |

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)

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 (Moscow, Russia)

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

Kenes T. Erimbetov, Dr. Sci. (Biol.) (Borovsk, Kaluga Region, Russia)

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

Leonid V. Kovalenko, Dr. Sci. (Chem.), Prof. (Moscow, Russia)

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

Aleksandr E. Kuznetsov, Dr. Sci. (Tech.), Prof. (Moscow, Russia)

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

Vladimir V. Martirosyan, Dr. Sci. (Tech.), Prof. of the RAS (Moscow, Russia)

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

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

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

Konstantin S. Ostrenko, Dr. Sci. (Biol.) (Borovsk, Kaluga Region, Russia)

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

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

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

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

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

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

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

Liliya V. Fedulova, Dr. Sci. (Tech.), Prof. of the RAS (Moscow, Russia)

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

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

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

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

Anatoliy T. Shchastnyj, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Vitebsk, Republic of Belarus)

JOURNAL BIOMED

| | |
|---|--|
| 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: | LTD «Publishing House «Triada». 170034, Russian Federation, Tver, Tchaikovsky Ave., 9, office 514 |
| Publication date: | 10.12.2022 |

■ ГЕНЕТИКА И ЭПИГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ-БИОМОДЕЛЕЙ

Е.С. Савченко, Н.С. Огнева, Н.Н. Каркищенко

Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека *HLA A*02:01:01:01* 10

■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

А.М. Зубалий, М.С. Нестеров, В.Н. Каркищенко, Д.В. Хвостов, Р.А. Агельдинов, С.В. Огнев

Содержание биологически активных веществ в мускусе кабарги сибирской в зависимости от спектра питания животных. 24

Н.В. Станкова, О.В. Алимкина, И.А. Помыткин, В.Н. Каркищенко

Анализ изменений базовых показателей биологических сред мини-пигов, перенесших экстремальные физические нагрузки. 39

■ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

М.Т. Гасанов, Ю.В. Фокин, С.Л. Люблинский, О.В. Алимкина, Л.А. Табоjackова, В.Н. Каркищенко

Доклинические исследования эффективности и безопасности комплекса биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги сибирской, в липосомированной лекарственной форме 48

В.В. Воробьева, О.С. Левченкова, П.Д. Шабанов

Блокада кальциевых каналов кардиомиоцитов кролика восстанавливает активность фермент-субстратных комплексов дыхательной цепи в модели вибрационно-опосредованной гипоксии. 63

О.Ю. Рыбалкина, Т.Г. Разина, Е.А. Киселева, Г.И. Калинкина, Н.В. Исайкина, Е.П. Зуева, В.В. Жданов

Оценка эффективности использования фенолсодержащих комплексов из различных частей рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia L.*) в онкологическом эксперименте 74

М.У. Сергалиева, А.А. Цибизова, О.А. Башкина, М.А. Самотруева

Изучение острой токсичности экстракта травы Астрагала лисьеого 86

■ РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ**М.Э. Султанлы**

Ультраструктурная характеристика аксодендритических и аксосоматических синапсов в орбитофронтальной коре белых лабораторных крыс на фоне малобелковой пищи после острого звукового воздействия94

Г.Н. Филимонова, О.В. Дюрягина, Н.И. Антонов

Особенности гистоструктуры крестцово-каудальной (копчиковой) дорсальной латеральной мышцы при моделировании заднего артродеза крестцово-подвздошного сустава102

В.С. Кохан, П.К. Анохин, Е.П. Пахлова, Н.Ю. Сарычева, И.Ю. Шамакина

Нарушение экспрессии мРНК мю- и каппа-опиоидных рецепторов в среднем мозге крыс с пренатальной алкогольной интоксикацией112

■ GENETICS AND EPIGENETICS OF ANIMAL BIOMODELS

Elena S. Savchenko, Nastasya S. Ogneva, Nikolay N. Karkischenko
 Embryological Aspects of Creating a New Humanized Transgenic Mouse Line
 with an Integrated Human Gene *HLA A*02:01:01:01*. 10

■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

**Anastasiia M. Zubalii, Maksim S. Nesterov, Vladislav N. Karkischenko,
 Daniil V. Khvostov, Ruslan A. Ageldinov, Sergey V. Ognev**
 Content of Biologically Active Substances in the Musk of Siberian Musk Deer
 Depending on Food Spectrum of Animal Nutrition 24

Nataliia V. Stankova, Oksana V. Alimkina, Igor A. Pomytkin, Vladislav N. Karkischenko
 Analysis of Variations in the Basic Indicators of Mini Pigs under Extreme
 Physical Exertion. 39

■ PRECLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE

**Melik T. Gasanov, Yuriy V. Fokin, Stanislav L. Lyublinskiy, Oksana V. Alimkina,
 Lidiya A. Taboyakova, Vladislav N. Karkischenko**
 Preclinical Studies of the Efficiency and Safety of a Complex of Biologically
 Active Substances Isolated from the Secretion of Siberian Musk Deer
 in a Liposomal Dosage Form. 48

Viktoriya V. Vorobieva, Olga S. Levchenkova, Petr D. Shabanov
 Blockade of Rabbit Cardiomyocyte Calcium Channels Restores the Activity
 of Enzyme-Substrate Complexes of the Respiratory Chain in a Model
 of Vibration-Mediated Hypoxia. 63

**Olga Yu. Rybalkina, Tatyana G. Razina, Elena A. Kiseleva, Galina I. Kalinkina,
 Nadezhda V. Isaikina, Elena P. Zueva, Vadim V. Zhdanov**
 Evaluation of the Efficiency of Phenol-Containing Complexes Extracted
 from Different Parts of *Sorbus Aucuparia L.* in an Oncological Experiment. 74

**Mariyam U. Sergaliev, Aleksandra A. Tsibizova, Olga A. Bashkina,
 Marina A. Samotrueva**
 Study of Acute Toxicity of an Herbal Extract of *Astragalus vulpinus*. 86

■ RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELLING

Maya E. Sultanly

Ultrastructural Characteristics of Axodendritic and Axosomatic Synapses
in the Orbitofrontal Cortex of White Laboratory Rats Associated
with Low-Protein Food after Acute Sound Exposure. 94

Galina N. Filimonova, Olga V. Diuriagina, Nikolai I. Antonov

Hystostructure Features of the Sacra-Caudal (Coccygeal) Dorsal Lateral
Muscle when Modeling Posterior Arthodesis of the Ileosacral Joint. 102

**Viktor S. Kokhan, Petr K. Anokhin, Ekaterina P. Pakhlova, Natalia Yu. Sarycheva,
Inna Yu. Shamakina**

Impaired Expression of Mu- and Kappa-Opioid Receptor mRNA
in the Midbrain of Rats with Prenatal Alcohol Intoxication. 112



ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ НОВОЙ ГУМАНИЗИРОВАННОЙ ТРАНСГЕННОЙ ЛИНИИ МЫШЕЙ С ИНТЕГРИРОВАННЫМ ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА *HLA-A*02:01:01:01*

Е.С. Савченко*, Н.С. Огнева, Н.Н. Каркищенко

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

Накопление научных данных в области фармакогенетики требует создания адекватных релевантных биомоделей, отражающих иммуногенетические особенности отдельных групп населения. Нами были получены родоначальники новой гуманизированной трансгенной линии мышей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01* человека, характерный для населения России. Для создания новой биомодели был использован метод инъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеусы зигот с последующим культивированием в CO₂-инкубаторе в течение ночи и переносом потенциально модифицированных эмбрионов на стадии двух бластомеров псевдобеременным самкам-реципиентам. Всего был получен и проанализирован 91 живой потомок, из которых 18 несли целевую модификацию генома. Полученные трансгенные животные были использованы для выведения новой линии животных-биомоделей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01* человека.

Ключевые слова: трансгеноз, трансплантация эмбрионов, липофекция, вирусная трансфекция, нуклеофекция, микроинъекции в пронуклеусы зигот

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания «Создание трансгенных гуманизированных биомоделей с интегрированными генами *HLA A*02:101* *βt* русского человека» (шифр: «Трансгеноз-2021»).

Для цитирования: Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека *HLA-A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-10-23>

Поступила 06.09.2022

Принята после доработки 07.11.2022

Опубликована 10.12.2022

EMBRYOLOGICAL ASPECTS OF CREATING A NEW HUMANIZED TRANSGENIC MOUSE LINE WITH AN INTEGRATED HUMAN GENE *HLA-A*02:01:01:01*

Elena S. Savchenko*, Nastasya S. Ogneva, Nikolay N. Karkischenko

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

The accumulation of scientific data in the field of pharmacogenetics requires the creation of adequate bio-models to reflect the immunogenetic characteristics of different population groups. We have obtained the ancestors of a new humanized transgenic mouse line carrying the human *HLA-A*02:01:01:01* gene, which is characteristic of the Russian population. The new biomodels was created using the pronuclei microinjection method of a linearized fragment of genetically engineered DNA construct into zygotes, followed by overnight cultivation in CO₂ incubator and transfer of potentially modified embryos at the stage of two

blastomere to pseudopregnant foster females. A total of 91 living offspring were obtained and analyzed, with 18 pups carrying the target genome modification. The resulting transgenic animals were used to create a new line of mouse biomodels carrying the human *HLA-A*02:01:01:01* gene.

Keywords: transgenesis, embryo transfer, lipofection, viral transfection, nucleofection, pronuclear microinjection

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

Funding: the work was carried out within the framework of the State assignment “Creation of transgenic humanized biomodels with integrated *HLA A*02:101 βt* genes of the Russian human” (code: “Transgenesis-2021”).

For citation: Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embryological aspects of creating a new humanized transgenic mouse line with an integrated human gene *HLA-A*02:01:01:01*. *Journal Biomed.* 2022;18(4):10–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-10-23>

Submitted 06.09.2022

Revised 07.11.2022

Published 10.12.2022

Введение

Современные биомедицинские исследования сложно представить вне контекста трансгенных животных. Организмы, генотип которых был искусственно отредактирован человеком, привнесшим в него новые гены и/или модификации уже существующих, позволяют исследователям создавать уникальные биомодели, демонстрирующие физиологические, биохимические, генетические или поведенческие особенности, характерные для конкретных патологических состояний [10, 29, 42, 57]. Создание биомоделей, максимально приближенных к реально наблюдаемой картине, способствует всестороннему детальному изучению патологии, что позволяет наметить пути и мишени для лечения или оптимизировать уже имеющиеся стратегии [14]. В ряде случаев, ввиду этических или прочих причин — например, в случае болезней человека — исследования на носителях заболевания невозможны, что тормозит прогресс создания эффективной терапии. Использование модифицированных клеточных линий [21] и гуманизированных трансгенных моделей, несущих гены человека, значительно упрощает и ускоряет процесс, позволяя получить интересные исследователей данные, что даёт

шансы на выживание людям, чьи болезни считались неизлечимыми [14].

Особую роль в патогенезе заболеваний играют гены главного комплекса гистосовместимости. Полиморфизм этих генов определяет возможности врождённого и адаптивного иммунитета человека. Многочисленные исследования, проведённые зарубежными и отечественными учёными, показали, что различные аллельные варианты генов главного комплекса гистосовместимости могут быть маркерами предрасположенности человека к определённым заболеваниям, либо, наоборот, оказывать протективный эффект. Сравнение частот встречаемости аллелей в популяциях и распространения заболеваний позволяет выявить возможные генетические кандидаты и лежащие в основе молекулярно-генетические механизмы заболеваний. Так, Л.П. Алексеевым с соавт. были проведены масштабные исследования в области иммуногенетики различных этнических групп населения России и близлежащих территорий, которые позволили по-новому взглянуть на прогнозирование развития и диагностику таких социально значимых заболеваний, как сахарный диабет 1-го типа и ВИЧ. Сравнительный анализ накопленных знаний по иммуногенетике и современные подходы к биомоделированию

дают исследователям мощный инструмент в создании терапии нового поколения: более избирательной, эффективной, персонализированной и безопасной.

Целью нашей работы стало создание адекватной биомодели, отражающей ключевые генетические особенности населения России. Анализ литературных данных показал, что наибольшая частота встречаемости характерна для аллели *HLA-A*02:01*. Более того, данная аллель широко представлена во многих популяциях (рис. 1), что увеличивает возможности её применения и позволяет экстраполировать полученные результаты на многие мировые сообщества. В России частота встречаемости может меняться в зависимости от региона, но, несмотря на значительные социальные, культурные и генетические отличия, характерные для регионов, данная аллель занимает лидирующие позиции при фенотипировании образцов крови. Наши собственные исследования совместно с НМИЦ гематологии подтвердили литературные данные, что доказывает необходимость создания трансгенных гуманизированных животных-моделей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01*, и является важнейшим

этапом для выяснения особенностей иммуногенетических механизмов патологических процессов и эффектов лекарств.

На первом этапе нами была создана гено-инженерная конструкция (ГИК), линейаризованный фрагмент (рис. 2) которой предназначен для интеграции в геном мыши. ГИК кодирует гибридную молекулу МНС I класса, а также содержит ряд регуляторных элементов, обеспечивающих сильную и стабильную экспрессию трансгена во всех клетках организма-биомодели. В состав химерной молекулы входит несколько ключевых компонентов: домен $\alpha 3$ комплекса H2 мыши, основная функция которого — взаимодействие с антиген-распознающим рецептором цитотоксических лимфоцитов; $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -домены *HLA-A*02:01:01:01* человека, которые образуют антиген-связывающую область молекулы. В отличие от аналогичных конструкций, которые были ранее использованы в других лабораториях, комплекс стабилизируется молекулой β_2 -микроглобулина человека, который через глицин-сериновый линкер соединён с $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменами. Линкер необходим для того, чтобы комплекс стабилизировался именно человеческим β_2 -микроглобулином. Линейный фрагмент ГИК имеет липкие

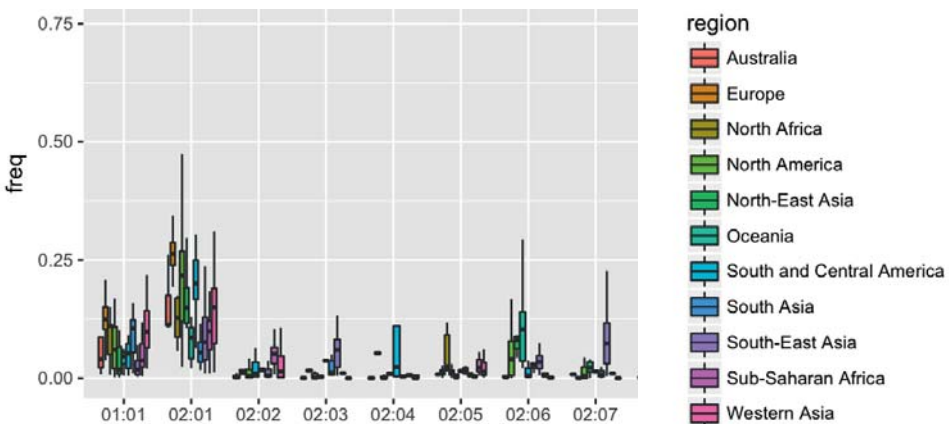


Рис. 1. Частоты распределения аллелей *HLA-A** в различных регионах мира [7].
 Fig. 1. *HLA-A** allele distribution frequencies in different world regions [7].

концы и может интегрироваться в геном по механизму негомологичного сшивания концов (NHEJ/illegitimate recombination) в ходе процесса репарации ДНК. При таком механизме интеграции встраивание трансгена происходит случайным образом в неопределённый участок генома.

Следующим этапом в процессе создания новой биомодели был выбор оптимального способа доставки редактирующего инструментария. На сегодняшний день наибольшее распространение получили четыре основных способа доставки: липофекция, вирусная трансфекция, нуклеофекция и микроинъекции в пронуклеусы зигот.

Липофекция — наиболее безопасный способ доставки, когда редактирующий инструментарий сам по себе или на специальном носителе (частицы и пр.) заключаются в липидную оболочку, которая затем сливается с цитоплазматической мембраной клетки. Возможность модифицировать липидную мембрану различными рецепторами позволяет адресно доставлять внутреннее содержимое конкретным клеткам-мишеням. Наиболее перспективным этот метод считается для адресной доставки лекарственных препаратов и генотерапии [16–18, 23], тогда как для создания трансгенных организмов применяется редко ввиду низкой эффективности. В области трансгенеза липофекция наибольшее применение получила для модификации генома сперматозоидов [9, 32].

Использование вирусов в качестве переносчиков позволяет более эффективно доставлять инструментарий в клетки, что нашло применение также в генотерапии [11, 34, 39, 40, 50, 60], доставке лекарственных агентов [51], создании вакцин нового поколения [24, 39, 45, 56, 60] и модификации различных клеточных культур [11]. За счёт сродства некоторых вирусов к определённым типам клеток возможна адресная доставка агентов к клеткам-мишеням и редактирование отдельных субпопуляций клеток в организме. В данном методе используется такая особенность вирусов, как возможность заражать клетку-хозяина, однако, в отличие от природных вирусов, искусственно собранные вирусы-переносчики не могут реплицироваться, поэтому их использование не влечёт за собой риски заражения для пациентов. Способность переносить редактирующий материал в клетку лентевирусами используется и для получения трансгенных организмов [43, 53].

Для *in vitro* редактирования клеточных культур часто применяются методы нуклеофекции, когда редактирующий агент доставляется в клетку через поры, образованные электрическим импульсом (электропорация). Метод позволяет получить большое количество модифицированных клеток, пригодных для дальнейших манипуляций, например, для редактирования конкретных клеточных линий [48] или вне-

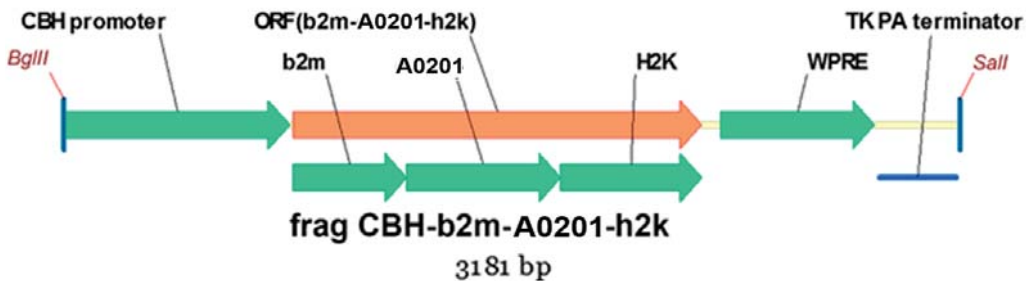


Рис. 2. Схема линейного фрагмента frag CBH-b2m_A0201-h2k ДНК, предназначенного для микроинъекций.
Fig. 2. Scheme of a linear DNA fragment frag CBH-b2m_A0201-h2k for microinjection.

сения изменений в геном стволовых клеток [12, 25], которые затем могут быть использованы при создании трансгенных организмов методом химер [15, 20, 28]. Химерные эмбрионы, содержащие два типа клеток — собственные и модифицированные, подсаживают реципиентам и затем анализируют полученное потомство. Метод позволяет с высокой эффективностью получать химер, однако для выведения линии, все клетки организма которой будут нести нужную модификацию, необходима длительная селекционная работа.

Наиболее широкое применение в области создания трансгенных организмов в настоящее время получил метод микроинъекций генетических конструкций в пронуклеус зиготы. Неоспоримыми достоинствами данного метода являются высокая эффективность редактирования и возможность получения трансгенного животного в одну стадию, что существенно упрощает процедуру и сокращает время на получение новой трансгенной линии. В совокупности с современными системами редактирования генома, метод получил широкое распространение для модификации генома разных видов животных и создания множества биомоделей [19, 31, 33, 36, 37, 41, 44, 52, 58, 59, 61]. Данный метод включает в себя четыре основных этапа: получение эмбрионов, проведение микроинъекций, трансплантация выживших потенциально модифицированных эмбрионов самкам-реципиентам и анализ полученного потомства и выявление особей, несущих искомую модификацию генома.

Учитывая особенности каждого из методов, для достижения нашей цели — получения новой гуманизированной трансгенной линии мышей, несущей ген человека *HLA-A*02:01:01:01*, мы решили использовать последний — микроинъекции в пронуклеусы зигот. Несмотря на трудоёмкость метода, он обладает рядом существенных преимуществ, таких как возможность

непосредственного контроля концентрации и объёма вносимого инструментария, однозначное визуальное подтверждение его доставки в клетку, а также возможность изменять и адаптировать параметры проведения микроинъекций в ходе выполнения процедуры.

В данной статье мы подробно остановимся на втором этапе создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей, а именно — на процессе получения родоначальников новой линии методом инъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеусы зигот. Полученная мышьяная модель станет прекрасным решением для широкого спектра исследовательских задач, в т. ч. исследования иммунных реакций, инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также разработки и тестирования вакцин и исследования в области фармакобезопасности и иммуногенности.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

В эксперименте использовались самки гибридных мышей линии СВА/Лас × С57В1/6 (F1) в возрасте 4-х недель (самки-доноры эмбрионов) и 1,5 мес. (самки-реципиенты), полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в системе ИВК при световом режиме 12/12, со свободным доступом к еде и воде.

Получение эмбрионов

Для вызывания суперовуляции самкам в возрасте 4 недели внутрибрюшинно вводили 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (Сергон, Чехия), а через 47–50 ч — 5 МЕ хорионического гонадотропина человека («Московский эндокринный завод», Россия) и подсаживали к плодовитым самцам на ночь. Утром отбирали самок с копулятивными пробками. Забой животных производили дислокацией шейных позвонков. Извлечение эмбрионов и проведение микроинъекций проводили в среде M2 («Sigma-Aldrich», США).

Микроинъекции генно-инженерной конструкции

Микроинъекции проводили на установке, включающей инвертированный микроскоп, оснащённый оптикой для контрастирования живых неокрашенных объектов (Nikon, объективы NAMC и DIC) и комплектом манипуляторов и автоматическим микроинъектором (Eppendorf). В эксперименте использованы самодельные стеклянные инструменты (пипетки для удерживания эмбрионов и иглы для микроинъекций). Линеаризованный фрагмент ДНК-конструкции, кодирующий гибридную молекулу МНС I класса (рис. 2), вводили в мужской пронуклеус зигот через микроиглу с внешним диаметром 1,5–2 мкм. Генно-инженерная конструкция содержалась в буфере TE для инъекций (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,4). Рабочая концентрация составляла 5–6 нг/мкл.

Культивирование эмбрионов

Зиготы, не разрушившиеся после микроинъекции, были поставлены на культивирование в среде M16 («Sigma Aldrich», США) в инкубатор с 5% CO₂ при постоянной температуре 37 °C на ночь. Для переноса реципиентам использовали только эмбрионы, которые успешно достигли стадии двух бластомеров.

Трансплантация эмбрионов

Для синхронизации цикла и получения достаточного количества особей, находящихся в подходящей фазе полового цикла (эструс), к моменту подсадки их к вазэктомизированным самцам самки-реципиенты также получали гормональные препараты по схеме, описанной выше, но, в отличие от доноров, получали сниженную дозировку препаратов (2,5 МЕ), чтобы избежать синдрома гиперстимуляции яичников и нарушений в функциональном слое эндометрия матки, которые значительно снижают возможность успешной имплантации и дальнейшего развития эмбрионов

[1]. Для трансплантации отбирали самок с копулятивными пробками, свидетельствующими об успешном покрытии вазэктомизированным самцом. Перенос эмбрионов осуществлялся на стадии двух бластомеров хирургическим методом в правый яйцевод наркотизированной самки-реципиента с помощью стеклянной пипетки. Трансплантация осуществлялась непосредственно в ампулу через прокол (стерильной иглой 29 G/30 G, между яичником и ампулой, в направлении ампулярной части яйцевода) или небольшой разрез стенки яйцевода (ножницы GILLS-VANNAS для капсулотомии, между яичником и ампулой, на небольшом удалении от ампулы). В одну самку переносилось 12–16 эмбрионов в минимальном количестве среды M2. Для анестезии использована комбинация препаратов Zoletyl 100 («Virbak», Франция) и Рометар («Bioveta», Чехия) из расчёта 25 мг/кг и 5 мг/кг соответственно. Для ускорения выхода животных из наркоза реципиентам сразу после трансплантации вводили Антиседан («Otion Pharma», Финляндия) из расчёта 0,5 мг/кг.

Верификация наличия целевой вставки

Анализ полученного потомства проводили через 21 день после рождения. Забор образцов тканей хвоста производили стерильными хирургическими инструментами. Верификацию наличия трансгена производили методом ПЦР в реальном времени с последующим подтверждением методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и их обсуждение

Получение эмбрионов

Выбранный нами метод получения родоначальников новой гуманизированной трансгенной линии мышей требует использования большого количества оплодотворённых яйцеклеток — зигот. Естественный эстральный цикл у мышей длится 4–5 дней, а в ходе одного цикла од-

новременно овулируют 5–10 яйцеклеток. Грамотное использование стимулирующих гормональных препаратов позволяет не только синхронизировать эстральные циклы самок, но и значительно увеличить число овулирующих за цикл фолликулов и сократить количество животных, вовлечённых в эксперимент. Нами была использована классическая схема с применением гонадотропина сыворотки жеребой кобылы и хорионического гонадотропина человека. В табл. 1 представлены результаты гормональной стимуляции самок-доноров по вышеописанной схеме.

Как видно из табл. 1, в среднем с одной гормонально подготовленной самки можно получить 25 морфологически нормальных зигот, пригодных для дальнейших манипуляций. Применение минимально эффективных доз препаратов позволяет нам избежать пагубного влияния гормонов на репродуктивный тракт животного [2], что может негативно отразиться на качестве получаемых эмбрионов и их потенциям к дальнейшему развитию.

Микроинъекции генно-инженерной конструкции

Полученные зиготы до процедуры микроинъекции культивировали в CO₂-инкубаторе в среде M16 («Sigma-Aldrich», США). Непосредственно перед процедурой эмбрионы отмывали в среде M2 («Sigma-Aldrich», США) и переносили в чашку Петри для ICSI. Количество вносимой

ДНК контролировали визуально по увеличению объёма мужского пронуклеуса. Зиготы, не разрушившиеся после микроинъекции, ставили на культивирование в CO₂-инкубатор на ночь. В табл. 2 представлены результаты микроинъекций, полученных от самок-доноров зигот.

Процедура микроинъекции достаточно травматична для развивающегося эмбриона, что требует от исследователя значительных навыков и аккуратности. Однако физико-химические факторы окружения, такие как температура, освещённость, влажность, pH среды и смеси для инъекций, качество минерального масла и пр., также способны повлиять на результат.

Одним из критических факторов, влияющим на жизнеспособность эмбрионов, является температура. Поддержание постоянной физиологической температуры среды для манипуляций обеспечивает нормальное функционирование клеточных систем развивающегося эмбриона вне репродуктивного тракта матери, поэтому процедуру необходимо проводить при постоянном внешнем подогреве. Значительные колебания этого параметра могут привести к серьёзным нарушениям внутриклеточного гомеостаза вплоть до остановки в развитии и гибели эмбриона.

Ещё одним фактором, определяющим успешность процедуры, является время проведения микроинъекции. На разных стадиях клеточного цикла активность фер-

Таблица 1. Результаты гормональной стимуляции самок-доноров зигот
Table 1. Results of hormonal stimulation of female zygote donors

| Доноров использовано | Получено яйцеклеток | | | Среднее кол-во оплодотворённых яйцеклеток на самку |
|----------------------|---------------------|-------------------|------|--|
| | Оплодотворённых | Неоплодотворённых | Брак | |
| 48 | 1231 | 126 | 102 | 25,6 |

Таблица 2. Выживаемость эмбрионов после микроинъекции ГИК
Table 2. Embryo survival after DNA microinjection

| Количество инъецированных зигот | Количество зигот, поставленных на культивирование | Выживаемость эмбрионов после микроинъекций, % |
|---------------------------------|---|---|
| 1231 | 825 | 67,02 |

ментов, отвечающих за репарацию повреждений, может существенно отличаться. Так, чем ближе фаза клеточного деления, тем ниже активность метаболических процессов в клетке, а, соответственно, эмбрион более уязвим для действия внешних факторов. Время играет ключевую роль не только в выживаемости эмбрионов после инъекции, но и в возникновении такого явления, как мозаицизм, когда полученный организм будет нести лишь часть клеток с отредактированным геномом. Мозаицизм широко распространён в живой природе, однако в случае получения трансгенных организмов методом инъекции ГИК в пронуклеус зиготы он является негативным побочным эффектом. Одной из причин возникновения этого явления принято считать позднее проведение микроинъекций, когда редактирующий инструментарий не успевает внести изменения в геном реципиента до первого деления клетки и сохраняется на более поздних стадиях развития, неравномерно распределяясь между бластомерами и выборочно редактируя геном некоторых из них.

Культивирование эмбрионов

В нашем исследовании мы использовали метод асинхронного переноса эмбрионов на стадии двух бластомеров (1-й день беременности) в яйцевод самок-реципиентов 0-го дня беременности. *In vitro* культивирование эмбрионов проводили в среде M16 («Sigma-Aldrich», США) под минеральным маслом в CO₂-инкубаторе в течение ночи (табл. 3). На утро для переноса отбирали только эмбрионы, успешно достигшие стадии двух бластомеров.

Использование метода асинхронного переноса позволило нам решить две важней-

шие задачи. Во-первых, культивирование в течение ночи позволяет отсеять эмбрионы, нежизнеспособные или со сниженным потенциалом к развитию, тем самым повысить качество переносимых эмбрионов. Во-вторых, асинхронный перенос даёт развивающемуся эмбриону дополнительные сутки на удвоение клеточного состава бластоцисты, что, с одной стороны, повышает её шансы на успешную интеграцию в эндометрий матки, а с другой стороны, позволяет не пропустить окно имплантации, когда матка рецептивна и готова принять эмбрион [2].

Трансплантация эмбрионов

В табл. 4 представлены результаты переноса потенциально модифицированных эмбрионов в репродуктивный тракт псевдобеременных самок-реципиентов.

В данной работе мы использовали модифицированный метод переноса эмбрионов через прокол/разрез стенки яйцевода непосредственно в ампулу. Ретроспективный анализ данных, полученных в нашей лаборатории по трансплантации эмбрионов разными методами, показал, что модификация способа переноса эмбрионов может оказывать непосредственное влияние на результаты эмбриотрансфера [6]. Выбранный нами метод, в отличие от классического переноса в воронку яйцевода, связан с меньшим хирургическим вмешательством, и, соответственно, со снижением дискомфорта реципиентов и вероятности развития негативных побочных эффектов (кровотечение, воспалительный процесс, нарушения поведения и пр. [22, 26, 27, 30, 35, 38, 47]) как во время, так и после операции, что соответствует современным стандартам GLP (Good Laboratory Practice) и концепции 3R

Таблица 3. Культивирование эмбрионов после микроинъекций ГИК
Table 3. Embryos cultivation after DNA microinjection

| Количество зигот, поставленных на культивирование | Количество зигот, успешно достигших стадии двух бластомеров | Уровень дробления, % |
|---|---|----------------------|
| 825 | 714 | 86,6 |

Таблица 4. Результаты трансплантации эмбрионов псевдобеременным самкам-реципиентам
Table 4. Results of embryo transfer to pseudopregnant foster females

| Уровень беременности (количество родивших реципиентов/количество реципиентов, взятых на трансплантацию) | Выживаемость потомства (количество выживших мышат/количество рождённых мышат) | Среднее количество потомков на самку (количество рождённых мышат/количество родивших реципиентов) | Среднее количество живых потомков на самку (количество рождённых живых мышат/количество родивших реципиентов) | Общий уровень рождаемости (количество живых мышат/всего трансплантировано всем реципиентам эмбрионов) | Уровень рождаемости среди беременных реципиентов (количество живых мышат/всего трансплантировано эмбрионов беременным самкам) |
|---|---|---|---|---|---|
| 63,04% (29/46) | 88,3% (91/103) | 3,55 (103/29) | 3,12 (91/29) | 12,8% (91/714) | 20,45% (91/445) |

[46]. Высокие показатели [6, 49] уровней беременности и рождаемости подтверждают целесообразность применения данного метода.

Анализ полученного потомства

Нами было получено 103 потомка, 91 из которых успешно достигли половозрелого состояния. Смертность потомства, как правило, наблюдалась в небольших помётах (1, редко — 2 мышонка) в первые дни постнатального развития вследствие каннибализма. В среднем, размер помёта составил 3–4 мышонка. После достижения возраста 3-х недель пробы тканей хвоста полученного потомства анализировали методом ПЦР в реальном времени с последующим подтверждением методом секвенирования по Сэнгеру. Из 91-й пробы 18 были подтверждены как положительные на присутствие целевой вставки — трансгена *HLA-A*02:01:01:01*, эффективность трансгенеза составила 19,7%. Соотношение полов среди трансгенных особей составило 1:1 (9 самцов и 9 самок). Полученные родоначальники (F0) новой гуманизированной трансгенной линии мышей, несущие ген человека *HLA-A*02:01:01:01*, были переданы сотрудникам вивария для проведения селекционной работы и выведения чистой линии.

Заключение

Таким образом, нами были получены родоначальники новой гуманизированной трансгенной линии мышей-биомоделей, несущие ген *HLA-A*02:01:01:01* чело-

века, методом микроинъекции генетической конструкции в пронуклеусы зигот. Полученные животные экспрессируют на поверхности клеток гибридную молекулу МНС I класса, состоящую из β_2 -микроглобулина человека, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменов HLA человека и $\alpha 3$ -домена комплекса H-2K мыши.

На сегодняшний день в НЦБМТ ФМБА России накоплен огромный опыт по созданию и поддержанию различных гуманизированных трансгенных биомоделей [3–5], несущих в т.ч. гены N-ацетилтрансферазы (*NAT1/NAT2*), ангиотензин-превращающего фермента 2 (*ACE2*) и человеческого лейкоцитарного антигена (*HLA*). Центр является одним из немногих в России, где возможна реализация полного цикла создания новой трансгенной биомодели — от разработки генно-инженерной конструкции до получения чистой линии и тестирования релевантности биомодели. Собственные исследования и ретроспективный анализ полученных данных позволяют нам совершенствовать операционные протоколы, что положительно сказывается не только на эффективности выполнения поставленных задач, но также соответствует современным тенденциям в области взаимодействия исследователей и лабораторных животных.

Созданная нами гуманизированная трансгенная биомодель, несущая ген человека *HLA-A*02:01:01:01*, является одной из базовых линий, которые наиболее ча-

сто используются для решения широкого круга задач, в частности, фармакогенетических исследований лекарственных препаратов и эффектов противоопухолевой терапии, а также изучения иммуногенетических механизмов защиты организма [8, 54, 55]. Также было показано, что антигенные эпитопы, имеющие высокое сродство для данной аллели, способны инициировать иммунный Т-клеточный ответ, схожий с реакцией на проникновение SARS-CoV-2, что может служить отправной точкой при разработке эффективной терапии новой коронавирусной инфекции и создании вакцин нового поколения [13]. Доминирующая роль аллели HLA-A*02:01 во многих мировых сообществах [7, 55], в т.ч. и в России, делает данную биомодель притягательным инструментом, позволяющим всесторонне изучить особенности иммунного ответа и возможные побочные эффекты, а также

составить достоверный прогноз возможности применения одной и той же терапии у различных групп населения.

Однако ключевой особенностью созданной нами биомодели является то, что экспрессирующаяся на поверхности клеток химерная молекула МНС I класса, в отличие от аналогичных моделей, стабилизируется β_2 -микроглобулином человека. Такой новаторский подход к дизайну конструкции позволил нам получить уникальную модель, которая ещё более приближена к человеку, а, значит, точнее воспроизводит особенности генетических механизмов иммунного ответа.

Полученные нами родоначальники (F0) новой гуманизированной трансгенной линии переданы сотрудникам вивария для выведения чистой линии животных-биомоделей, несущих ген HLA-A*02:01:01:01 человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Айзятуллова Э.М., Носенко Е.Н., Волина В.В., Смолянинова Е.И., Айзятуллова Д.Р., Овсяник М.А. Динамика изменений в эндометрии и миометрии маток мышей при экспериментальном моделировании синдрома гиперстимуляции яичников и влияние на них терлипессина. *Архив клинической и экспериментальной медицины*. 2014;23(2):144–148. [Ayzyatulova E.M., Nosenko E.N., Volina V.V., Smolyaninova E.I., Ayzyatulova D.R., Ovsyanik M.A. Dinamika izmeneniy v endometrii i miometrii matok myshey pri eksperimental'nom modelirovanii sindroma giperstimulyatsii yaichnikov i vliyaniye na nikh terlipressina [Dynamics of changes in the endometrium and myometrium of the uterus of mice in experimental modeling of ovarian hyperstimulation syndrome and the effect of terlipressin on them]. *Arkhiv klinicheskoy i eksperimental'noy meditsiny* [Archive of Clinical and Experimental Medicine]. 2014;23(2):144–148. (In Russian)].
2. Вагина И.Н., Евсиков С.В., Соломко А.П. Факторы, определяющие готовность бластоцист мышей к имплантации. *Биополимеры и клетка*. 1997;13(2):161–167. [Vagina I.N., Evsikov S.V., Solomko A.P. Faktory, opredelyayushchie gotovnost' blastotsist myshey k implantatsii [Factors determining the readiness of mouse blastocysts for implantation]. *Biopolimery i kletka* [Biopolymers and the cell]. 1997;13(2):161–167. (In Russian)].
3. Каркищенко В.Н., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Матвеев Е.Л., Петрова Н.В., Рябых В.П., Ревякин А.О., Станкова Н.В., Семёнов Х.Х. Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека NAT1 и NAT2. *Биомедицина*. 2016;1:74–84. [Karkischenko V.N., Bolotskih L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabyh V.P., Revyakin A.O., Stankova N.V., Semenov H.H. Sozdaniye liniy transgennykh zhivotnykh-modeley s genami cheloveka NAT1 i NAT2 [Creation of lines of transgenic animal models with human NAT1 and NAT2 genes]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2016;1:74–84. (In Russian)].
4. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., Езерский В.А., Жукова О.Б., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека. *Биомедицина*. 2016;1:52–65. [Karkischenko V.N., Ryabyh V.P., Bolotskih L.A., Semenov H.H., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Stolyarova V.N., Trubicina T.P. Fiziologo-embriologicheskie aspekty sozdaniya trans-

- gennykh myshey s integrirovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka [Physiological and embryological aspects of creation of transgenic mice with integrated human NAT1 and NAT2 genes]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:52–65. (In Russian)].
- Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2) человека. *Биомедицина*. 2016;1:4–17. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Karkischenko N.N., Dulya M.S., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., Lazarev V.N., Maksimenko S.V., Petrova N.V., Stolyarova V.N., Trubicina T.P. Molekulyarno-geneticheskie aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshey s integrirovannymi genami N-atsetiltransferazy (NAT1 i NAT2) cheloveka [Molecular genetic aspects of the technology for obtaining transgenic mice with integrated human N-acetyltransferase (NAT1 and NAT2) genes]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:4–17. (In Russian)].
 - Савченко Е.С., Огнева Н.С., Максименко С.В., Жукова О.Б. Сравнение способов хирургической трансплантации эмбрионов мыши псевдобеременным самкам-реципиентам. *Биомедицина*. 2021;3E:80–88. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Maksimenko S.V., Zhukova O.B. Sravnenie sposobov khirurgicheskoy transplantatsii embrionov myshi psevdoberemennym samkam-retsipientam [Comparison of surgical transfer of mouse embryos to pseudo-pregnant female recipients]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;3E:80–88. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-80-88.
 - <http://www.allelefrequencies.net/hla.asp>
 - Bai J., Wang J., Yang Y., Wang F., He A., Zhang W. Identification of HLA-A*0201-restricted CTL epitopes for MLAA-34-specific immunotherapy for acute monocytic leukemia. *J. Immunother.* 2021;44(4):141–150. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000350.
 - Ball B.A., Sabeur K., Allen W.R. Liposome-mediated uptake of exogenous DNA by equine spermatozoa and applications in sperm-mediated gene transfer. *Equine Vet. J.* 2008;40(1):76–82. DOI: 10.2746/042516407X235786.
 - Beckford-Vera D.R., Gonzalez-Junca A., Janneck J.S., Huynh T.L., Blecha J.E., Seo Y., Li X., VanBrocklin H.F., Franc B.L. PET/CT imaging of human TNF α using [⁸⁹Zr]certolizumab pegol in a transgenic preclinical model of rheumatoid arthritis. *Mol. Imaging Biol.* 2020;22(1):105–114. DOI: 10.1007/s11307-019-01363-0.
 - Chahal P.S., Schulze E., Tran R., Montes J., Kamen A.A. Production of adeno-associated virus (AAV) serotypes by transient transfection of HEK293 cell suspension cultures for gene delivery. *J. Virol. Methods.* 2014;196:163–173. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.10.038.
 - Chatterjee P., Cheung Y., Liew C. Transfecting and nucleofecting human induced pluripotent stem cells. *J. Vis. Exp.* 2011;(56):3110. DOI: 10.3791/3110.
 - Chen Z., Ruan P., Wang L., Nie X., Ma X., Tan Y. T and B cell epitope analysis of SARS-CoV-2 S protein based on immunoinformatics and experimental research. *J. Cell Mol. Med.* 2021;25(2):1274–1289. DOI: 10.1111/jcmm.16200.
 - Chu M.L., Moran E. The limb-girdle muscular dystrophies: Is treatment on the horizon? *Neurotherapeutics.* 2018;15(4):849–862. DOI: 10.1007/s13311-018-0648-x.
 - Coward K., Kubota H., Parrington J. In vivo gene transfer into testis and sperm: Developments and future application. *Arch. Androl.* 2007;53(4):187–197. DOI: 10.1080/01485010701426455.
 - Dass C.R. Biochemical and biophysical characteristics of lipoplexes pertinent to solid tumour gene therapy. *Int. J. Pharm.* 2002;241(1):1–25. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00194-1.
 - Dass C.R., Burton M.A. Lipoplexes and tumours. A review. *J. Pharmacol.* 1999;51(7):755–770. DOI: 10.1211/0022357991773113.
 - Dass C.R., Su T. Delivery of lipoplexes for gene therapy of solid tumours: Role of vascular endothelial cells. *J. Pharmacol.* 2000;52(11):1301–1317. DOI: 10.1211/0022357001777450.
 - Dong Zh., Dong X., Jia W., Cao Sh., Zhao Q. Improving the efficiency for generation of genome-edited zebrafish by labeling primordial germ cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2014; 55:329–334. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.08.020.
 - Du Y., Xie W., Zhang F., Liu C. Chimeric mouse generation by ES cell blastocyst microinjection and uterine transfer. *Methods Mol. Biol.* 2019;1874:99–114. DOI: 10.1007/978-1-4939-8831-0_6.
 - Fan D., Liu T., Li C., Jiao B., Li S., Hou Y., Luo K. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in populus in the first generation. *Sci. Rep.* 2015;5:12217. DOI: 10.1038/srep12217.
 - Gaertner D., Hallman T., Hankenson F., Batchelder M. Anesthesia and analgesia in rodents. In: Fish R., Brown M., Danneman P., Karas A., ed. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. 2nd ed. London, UK: Academic, 2011:239–282.
 - Gao X., Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 1995;2(10):710–722.
 - Hensel J.A., Khattar V., Ashton R., Ponnazhagan S. Recombinant AAV-CEA tumor vaccine in combination with an immune adjuvant breaks tolerance and provides protective immunity. *Mol. Ther. Oncolytics.* 2018;12:41–48. DOI: 10.1016/j.omto.2018.12.004.
 - Hohenstein K.A., Pyle A.D., Chern J.Y., Lock L.F., Donovan P.J. Nucleofection mediates high-efficiency stable gene knockdown and transgene ex-

- pression in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(6):1436–1443. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0857.
26. Koblischke P., Kindahl H., Budik S., Aurich J., Palm F., Walter I., Kolodziejek J., Nowotny N., Hoppen H.O., Aurich C. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology*. 2008;70(7):1147–1158. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.037.
27. Lamas S., Franquinho F., Morgado M., Mesquita J.R., Gärtner F., Amorim I. C57BL/6J and B6129F1 embryo transfer: Unilateral and bilateral transfer, embryo number and recipient female background control for the optimization of embryo survival and litter size. *Animals (Basel)*. 2020;10(8):1424. DOI: 10.3390/ani10081424.
28. Larson M.A. Blastocyst microinjection with embryonic stem cells. *Methods Mol. Biol.* 2020;2066:83–88. DOI: 10.1007/978-1-4939-9837-1_6.
29. Levedakou E.N., Popko B. Rewiring enervated: Thinking LARGER than myodystrophy. *J. Neurosci. Res.* 2006;84(2):237–243. DOI: 10.1002/jnr.20896.
30. Lerch S., Tolksdorf G., Schütz P., Brandwein C., Dormann C., Gass P., Chourbaji S. Effects of embryo transfer on emotional behaviors in C57BL/6 mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2016;55(5):510–519.
31. Lin C.Y., Su Y.H. Genome editing in sea urchin embryos by using a CRISPR/Cas9 system. *Dev. Biol.* 2016;409(2):420–428. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.11.018.
32. Lotti S.N., Polkoff K.M., Rubessa M., Wheeler M.B. Modification of the genome of domestic animals. *Anim. Biotechnol.* 2017;28(3):198–210. DOI: 10.1080/10495398.2016.1261874.
33. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Zh., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen Sh., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Zh., Liu Y.-G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant*. 2015; 8(8): 1274–1284. DOI: 10.1016/j.molp.2015.04.007.
34. Madrigal J.L., Shams S., Stilhano R.S., Silva E.A. Characterizing the encapsulation and release of lentivectors and adeno-associated vectors from degradable alginate hydrogels. *Biomater. Sci.* 2019;7(2):645–656. DOI: 10.1039/c8bm01218k.
35. Mahabir E., Volland R., Landsberger A., Manz S., Na E., Urban I., Michel G. Reproductive performance after unilateral or bilateral oviduct transfer of 2-cell embryos in mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2018;57(2):110–114.
36. Mianné J., Codner G.F., Caulder A., Fell R., Hutchison M., King R., Stewart M.E., Wells S., Teboul L. Analysing the outcome of CRISPR-aided genome editing in embryos: Screening, genotyping and quality control. *Methods*. 2017;121–122:68–76. DOI: 10.1016/j.jymeth.2017.03.016.
37. Mizuno S., Dinh T.T.H., Kato K., Mizuno-Iijima S., Tanimoto Y., Daitoku Y., Hoshino Y., Ikawa M., Takahashi S., Sugiyama F., Yagami K. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm. Genome*. 2014;25(7–8):327–334. DOI: 10.1007/s00335-014-9524-0.
38. Munné S., Alikani M., Tomkin G., Grifo J., Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil. Steril.* 1995;64(2):382–391.
39. Nidetz N.F., McGee M.C., Tse L.V., Li C., Cong L., Li Y., Huang W. Adeno-associated viral vector-mediated immune responses: Understanding barriers to gene delivery. *Pharmacol. Ther.* 2020;207:107453. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.107453.
40. Ochakovski G.A., Bartz-Schmidt K.U., Fischer M.D. Retinal gene therapy: Surgical vector delivery in the translation to clinical trials. *Front Neurosci.* 2017;11:174. DOI: 10.3389/fnins.2017.00174.
41. Oliver D., Yuan S., McSwiggan H., Yan W. Pervasive genotypic mosaicism in founder mice derived from genome editing through pronuclear injection. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0129457. DOI: 10.1371/journal.pone.0129457.
42. Paquet D., Kwart D., Chen A., Sproul A., Jacob S., Teo S., Olsen K.M., Gregg A., Noggle S., Tessier-Lavigne M. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*. 2016;533(7601):125–129. DOI: 10.1038/nature17664.
43. Park F. Lentiviral vectors: Are they the future of animal transgenesis? *Physiol. Genomics*. 2007;31(2):159–173. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00069.2007.
44. Qin W., Dion S.L., Kutny P.M., Zhang Y., Cheng A.W., Jillette N.L., Malhotra A., Geurts A.M., Chen Y.G., Wang H. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics*. 2015;200(2):423–430. DOI: 10.1534/genetics.115.176594.
45. Rghei A.D., van Lieshout L.P., Santry L.A., Guilleman M.M., Thomas S.P., Susta L., Karimi K., Bridle B.W., Wootton S.K. AAV vectored immunoprophylaxis for filovirus infections. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2020;5(4):169. DOI: 10.3390/tropicalmed5040169.
46. Russell W.M.S., Burch R.L. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen & Co Ltd., 1959: 238.
47. Sarvari A., Naderi M.M., Sadeghi M.R., Akhondi M.M. A technique for facile and precise transfer of mouse embryos. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2013;5(1):62–65.
48. Scherer O., Maeß M.B., Lindner S., Garscha U., Weinigel C., Rummeler S., Werz O., Lorkowski S. A procedure for efficient non-viral siRNA transfection of primary human monocytes using nucleofec-

- tion. *J. Immunol. Methods*. 2015;422:118–124. DOI: 10.1016/j.jim.2015.04.007.
49. Schlapp G., Goyeneche L., Fernández G., Menchaca A., Crispo M. Administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid at embryo transfer improves maintenance of pregnancy and embryo survival in recipient mice. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015;32(2):271–275. DOI: 10.1007/s10815-014-0378-x.
50. Schnabolk G., Parsons N., Obert E., Annamalai B., Nasarre C., Tomlinson S., Lewin A.S., Rohrer B. Delivery of CR2-fH using AAV vector therapy as treatment strategy in the mouse model of choroidal neovascularization. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2017;9:1–11. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.11.003.
51. Shih C.S., Laurie N., Holzmacher J., Spence Y., Nathwani A.C., Davidoff A.M., Dyer M.A. AAV-mediated local delivery of interferon-beta for the treatment of retinoblastoma in preclinical models. *Neuromolecular Med.* 2009;11(1):43–52. DOI: 10.1007/s12017-009-8059-0.
52. Singh P., Schimenti J.C., Bolcun-Filas E. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*. 2015;199(1):1–15. DOI: 10.1534/genetics.114.169771.
53. Tesson L., Cozzi J., Ménoret S., Rémy S., Usal C., Fraichard A., Anegon I. Transgenic modifications of the rat genome. *Transgenic Res.* 2005;14(5):531–546. DOI: 10.1007/s11248-005-5077-z.
54. Thomas R., Shaath H., Naik A., Toor S.M., Elkord E., Decock J. Identification of two HLA-A*0201 immunogenic epitopes of lactate dehydrogenase C (LDHC): Potential novel targets for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2020;69(3):449–463. DOI: 10.1007/s00262-020-02480-4.
55. Valkenburg S.A., Josephs T.M., Clemens E.B., Grant E.J., Nguyen T.H., Wang G.C., Price D.A., Miller A., Tong S.Y., Thomas P.G., Doherty P.C., Rossjohn J., Gras S., Kedzińska K. Molecular basis for universal HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell immunity against influenza viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016;113(16):4440–4445. DOI: 10.1073/pnas.1603106113.
56. van den Berg F.T., Makoah N.A., Ali S.A., Scott T.A., Mapengo R.E., Mutsunguma L.Z., Mkhize N.N., Lambson B.E., Kgagudi P.D., Crowther C., Abdool Karim S.S., Balazs A.B., Weinberg M.S., Ely A., Arbuthnot P.B., Morris L. AAV-mediated expression of broadly neutralizing and vaccine-like antibodies targeting the HIV-1 envelope V2 region. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019;14:100–112. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.06.002.
57. van Vuuren A.J., van Roon J.A., Walraven V., Stuij I., Harmsen M.C., McLaughlin P.M., van de Winkel J.G., Thepen T. CD64-directed immunotoxin inhibits arthritis in a novel CD64 transgenic rat model. *J. Immunol.* 2006;176(10):5833–5838. DOI: 10.4049/jimmunol.176.10.5833.
58. Varshney G.K., Pei W., LaFave M.C., Idol J., Xu L., Gallardo V., Carrington B., Bishop K., Jones M., Li M., Harper U., Huang S.C., Prakash A., Chen W., Sood R., Ledin J., Burgess S.M. High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Genome Res.* 2015;25(7):1030–1042. DOI: 10.1101/gr.186379.114.
59. Wang X., Yu H., Lei A., Zhou J., Zeng W., Zhu H., Dong Z., Niu Y., Shi B., Cai B., Liu J., Huang S., Yan H., Zhao X., Zhou G., He X., Chen X., Yang Y., Jiang Y., Shi L., Tian X., Wang Y., Ma B., Huang X., Qu L., Chen Y. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 2015;5:13878. DOI: 10.1038/srep13878.
60. Zabaleta N., Dai W., Bhatt U., Chichester J.A., Sanmiguel J., Estelien R., Michalson K.T., Diop C., Maciorowski D., Qi W., Hudspeth E., Cucalon A., Dyer C.D., Pampena M.B., Knox J.J., LaRocque R.C., Charles R.C., Li D., Kim M., Sheridan A., Storm N., Johnson R.I., Feldman J., Hauser B.M., Zinn E., Ryan A., Kobayashi D.T., Chauhan R., McGlynn M., Ryan E.T., Schmidt A.G., Price B., Honko A., Griffiths A., Yaghmour S., Hodge R., Betts M.R., Freeman M.W., Wilson J.M., Vandenbergh L.H. Immunogenicity of an AAV-based, room-temperature stable, single dose COVID-19 vaccine in mice and non-human primates. *bioRxiv [Preprint]*. 2021; 2021.01.05.422952. DOI: 10.1101/2021.01.05.422952.
61. Zhang W.W., Matlashewski G. CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania donovani*. *MBio*. 2015;6(4):e00861. DOI: 10.1128/mBio.00861-15.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Савченко Елена Сергеевна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: savelaine@gmail.com

Огнева Настасья Сергеевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

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

Nastasya S. Ogneva, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н.,
проф., чл.-корр. РАН, акад. РАРАН, ФГБУН «Науч-
ный центр биомедицинских технологий ФМБА
России»;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof.,
Corr. Member of the Russian Academy of Sciences,
Acad. of the Russian Academy of Rocket and
Artillery Sciences, Scientific Center of Biomedical
Technologies of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В МУСКУСЕ КАБАРГИ СИБИРСКОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПЕКТРА ПИТАНИЯ ЖИВОТНЫХ

А.М. Зубалий^{1,*}, М.С. Нестеров¹, В.Н. Каркищенко¹, Д.В. Хвостов^{1,2}, Р.А. Агельдинов¹,
С.В. Огнев¹

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

² ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
109316, Российская Федерация, Москва, ул. Талалихина, 26

Проведено исследование содержания биологически активных веществ методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии с применением дериватизации силилированием в прижизненно полученном мускусе кабарги. Проведено сравнение химического состава мускуса кабарги сибирской в природных и вольерных условиях. Выявлено влияние спектра питания кабарги на содержание биологически активных компонентов мускуса, прежде всего веществ андростероидного профиля. Подробно представлены результаты содержания наиболее значимых компонентов мускуса кабарги, имеющих биологические эффекты. Установлено, что увеличение разнообразия поедаемых кормов приводит к улучшению качественного состава биологически активных веществ мускуса, получаемого от самцов кабарги при вольерных условиях содержания.

Ключевые слова: газовая хроматография, масс-спектрометрия, дериватизация, андростероиды, жирные кислоты, препуциальная железа кабарги сибирской, рацион питания кабарги, условия содержания кабарги

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания «Разработка научно-технической документации с целью получения возобновляемых источников сырья биологического происхождения для производства фармацевтических субстанций и биологически активных веществ» (шифр: «Питомник-НЦБМТ»).

Для цитирования: Зубалий А.М., Нестеров М.С., Каркищенко В.Н., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Огнев С.В. Содержание биологически активных веществ в мускусе кабарги сибирской в зависимости от спектра питания животных. *Биомедицина*. 2022;18(4):24–38. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-24-38>

Поступила 08.08.2022

Принята после доработки 17.11.2022

Опубликована 01.12.2022

CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN THE MUSK OF SIBERIAN MUSK DEER DEPENDING ON FOOD SPECTRUM OF ANIMAL NUTRITION

Anastasiia M. Zubalii^{1*}, Maksim S. Nesterov¹, Vladislav N. Karkischenko¹,
Daniil V. Khvostov^{1,2}, Ruslan A. Ageldinov¹, Sergey V. Ognev¹

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

² V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences
109316, Russian Federation, Moscow, Talalikhina Str., 26

The content of biologically active substances in the gland secretion of Siberian musk deer obtained *in vivo* was studied by gas chromatography-mass spectrometry using derivatization by silylation. The musk chemical composition of animals held under natural conditions and in captivity was compared. The food spectrum of Siberian musk deer was found to affect the content of biologically active components in the musk, primarily of androsteroid substances. The results of evaluating the content of musk components exhibiting the most pronounced biological effects are presented. An increase in the diversity of food spectrum was established to improve the qualitative composition of biologically active substances in the musk obtained from the adult males of Siberian musk deer held in captivity.

Keywords: gas chromatography, mass spectrometry, derivatization, androsteroids, fatty acids, preputial gland of musk deer, food spectrum of musk deer, musk deer farming

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

Funding: the work was carried out within the framework of the State assignment “Development of scientific and technical documentation for the purpose of obtaining renewable sources of raw materials of biological origin for the production of pharmaceutical substances and biologically active substances” (code: Nursery-SCMBT).

For citation: Zubalii A.M., Nesterov M.S., Karkischenko V.N., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Ognev S.V. Content of Biologically Active Substances in the Musk of Siberian Musk Deer Depending on Food Spectrum of Animal Nutrition. *Journal Biomed.* 2022;18(4):24–38. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-24-38>

Submitted 08.08.2022

Revised 17.11.2022

Published 01.12.2022

Введение

Кабарга (*Moschus moschiferus* L., 1758) — исчезающий вид копытных млекопитающих, который включён в список Международной Красной книги со статусом уязвимого (vulnerable) [9]. Дальнейшие исследования показали, что этот вид сокращается более серьёзно, чем предполагалось, и может быть отнесён к категории находящихся под угрозой исчезновения [1, 5]. Основная причина устойчивого снижения численности вида — это массовое браконьерство с целью получения мускуса — секрета препуциальной железы самцов кабарги. Современные фак-

тические ресурсы вида в России не превышают 25–30 тыс. особей, что намного ниже официальных данных [6].

Введение кабарги в зоокультуру путём полувольного вольерного содержания является наиболее перспективным способом использования биологических ресурсов кабарги. Методика прижизненного получения мускуса позволяет получать сырьё для коммерческого использования, без ущерба природным популяциям [7, 12]. Однако остаётся ряд нерешённых вопросов, касающихся оптимизации кормления и содержания кабарги для получения высококачественного

мускуса как сырья для производства биологически активных добавок.

Мускус кабарги с древних времён используется в традиционной восточной медицине при широком спектре заболеваний и как общеукрепляющее средство для поддержания жизнедеятельности и активного долголетия [2, 4, 8]. Современные исследования биологической активности мускуса показали, что эти препараты имеют не только гормональную активность, актуальную в андрологии и гинекологии, но и обладают выраженными противовоспалительными свойствами, широко применяются при нарушениях иммунной системы, неврологических расстройствах, заболеваниях сердечно-сосудистой системы и других патологиях [10].

Мускус кабарги является сложным комплексом химических соединений разных классов: липидов (в т. ч. стероидов с гормональной активностью, насыщенных и ненасыщенных жирных кислот), пептидов, кетонов, альдегидов, ароматических производных и др. [2–4, 10].

Установлено, что биологическая активность различных образцов мускуса может очень сильно варьировать в зависимости от разных факторов, таких как возраст, физиологическое состояние животных, экологические особенности содержания [11].

В связи с этим **целью** нашего исследования стало изучение влияния условий содержания и питания кабарги на химический состав биологически активных веществ (БАВ), производимых животными.

Материалы и методы

Животные и рацион питания

Было проведено сравнение химического состава мускуса, полученного от самцов кабарги в питомнике филиала «Алтайский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Отбор проб мускуса проводили без ущерба для здоровья животных по методике прижизненной экстракции

мускуса самцов кабарги сибирской, разработанной в НЭБ «Черноголовка» ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН [7]. Данная методика была апробирована, адаптирована и внедрена в питомнике филиала «Алтайский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Основу поголовья питомника составляют три размножающиеся пары животных, отловленных в природе в конце 2019 г. Возраст самцов при отлове составлял примерно 5–6 лет, т. е. они были половозрелыми и имели активно функционирующую препуциальную железу, продуцирующую мускус. Животные были клинически здоровы, средней упитанности, содержались семейными парами (1 самец + 1 самка) в вольерах питомника, от каждой пары в 2021 и 2022 гг. было получено потомство. Содержимое препуциальной железы отбиралось в 2020, 2021 и 2022 гг., один раз в год (в июле-августе). Мускус из проб 2020 г. отбора можно считать соответствующим вольному содержанию и питанию, т. к. животные были недавно изъяты из природной среды, и, кроме того, на территории вольеров питомника находился значительный запас (по количеству и разнообразию кормовых растений) естественной кормовой базы. Далее животные были постепенно адаптированы к основному рациону питомника, который содержит следующие корма: древесный лишайник, веники из растений лиственных пород, грибы, овсяная крупа, сухофрукты (яблоки), витаминно-минеральный комплекс.

Пробы мускуса 2021 г. были взяты от самцов кабарги, питающихся этим рационом, в течение года после предыдущей экстракции мускуса. Далее проводилась оптимизация рациона кормления животных, находящихся на вольерном содержании, с целью повышения качественного состава БАВ, получаемых от них. Оптимизация рационов была направлена на дополнение основного рациона кабарги, содержащей-

ся в искусственных условиях, разработанными премиксами и добавками до уровня разнообразия состава кормов, потребляемых животными в естественных условиях обитания. В состав премиксов входили следующие компоненты, повышающие неспецифическую резистентность организма животных к неблагоприятным факторам среды и обеспечивающие поступление широкого спектра веществ, оказывающих регуляторное воздействие на физиолого-биохимические процессы в организме животных: жмых копеешника забытого (*Hedysarum neglectum*), экстракты лимонника китайского (*Schisandra chinensis*), левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*), гвоздичного дерева (*Syzygium aromaticum*), алтея лекарственного (*Althaea officinalis*), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis*), эфирное масло рододендрона даурского (*Rhododendron dauricum*), уснеевая кислота, лактулоза, инулин. Пробы мускуса в 2022 г. были получены от самцов, получающих оптимизированные рационы с добавлением премиксов по рецептуре ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Биоаналитические исследования

Пробы мускуса кабарги для исследования были переданы в лабораторию биоаналитических исследований ФГБУН НЦБМТ ФМБА России из филиала «Алтайский». Полученные пробы были разделены на три группы:

- 1) мускус, полученный от кабарги естественного кормления и содержания (2020);
- 2) мускус, полученный от кабарги, содержащейся в вольерных условиях с обычным кормовым рационом (2021);
- 3) мускус, полученный от животных в вольерных условиях, потреблявших рацион с премиксами и добавками (2022).

В каждой группе анализировался усреднённый образец, составленный из индивидуальных проб. Качественный и количественный анализ полученных образцов мускуса проводили на ГХ/МС-анализаторе

с масс-спектрометрическим детектором «Хроматэк», сопряжённым с газовым хроматографом «Хроматэк-Кристалл 5000» и жидкостным дозатором ДАЖ-2М (ЗД). Для наибольшей информативности ГХ/МС проводились следующие стадии пробоподготовки: экстракция этилацетатом, упаривание, концентрирование и дериватизация силилированием.

Подготовка проб на ГХ/МС

При подготовке проб для анализа образцы мускуса тщательно перемешивали и измельчали до прохода через сито. Перед измельчением пробы с высокой влажностью высушивали при температуре не выше 50 °С в течение 3 ч. Около 0,03 г измельчённого сырья помещали в стеклянную вialу с закручивающейся крышкой вместимостью 2 мл, добавляли 1 мл этилацетата (соотношение сырьё/растворитель: 1/10–1/50), тщательно вортиксовали. Вialу помещали на плитку и нагревали при 50 °С в течение 20–24 ч. Отбирали 200 мкл раствора, центрифугировали при 12000 об./мин (4 °С) в течение 10 мин. Далее работали с супернатантом.

Во вставку объёмом 250 мкл добавляли 20 мкл надосадочной жидкости и 20 мкл дериватирующего агента (силилирование BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) + TMCS (Trimethylchlorosilane) (99:1). Вialу со вставкой ставили на плитку при 80 °С в течение 60 мин. Добавляли 70 мкл этилацетата (концентрация 5–20 мг/мл по сырью), закрывали, перемешивали и ставили на вкол.

Режим ГХ/МС анализа

Выбрана следующая температурная программа: начальная температура — 60,0 °С; 3,0 мин; 7,0 °С/мин до 170,0 °С; 0,0 мин; 3,5 °С/мин до 205,0 °С; 0,0 мин; 7,0 °С/мин до 300,0 °С и выдерживание 14,0 мин.

МС: Деление потока 10,0. Температура источника ионов — 200 °С. Температура переходной линии — 290 °С. Диапазон сканирования — 50–650, длительность скана —

0,3 с. Колонка Phenomenex ZB-DRUG-1 30 м×0,25 мм×0,25 мкм. Время анализа — 56,29 мин, скорость потока — 0,6 мл/мин, объём вводимой пробы — 1 мкл.

Для надёжной идентификации дериватов использовали автоматическую базу поиска и идентификации данных хромато-масс-спектрометрии NIST17 MS Library. Весь пул хроматографически разделённых компонентов был подвергнут ранжированию по вкладам площадей каждого компонента в общий ионный ток и степени достоверности предложенных структур.

Результаты и их обсуждение

В данном эксперименте использовали колонку Phenomenex, которая позволяет разделить компоненты сложной пробы с дериватизацией. Выбран длинный режим: начинающийся с 60,0 °С, с медленным градиентом в 7,0 °С до конечной температуры 300,0 °С, которая держалась в течение 10,0 мин. Такая хроматограмма позволяет разделить и проанализировать многокомпонентный состав сложной смеси. При использовании метода дериватизации силилированием для всех фракций экстрактов мускуса кабарги время удерживания полученных продуктов изменяется, а форма

пика компонента значительно улучшается (рис. 1).

Известны многочисленные варианты эффективной дериватизации первичных и вторичных аминов, карбоновых кислот, спиртов, стероидов методом силилирования. Для ГХ/МС анализа определяемые аналиты химически модифицируются для обеспечения более разделяемых пиков с улучшенными хроматографическими свойствами — временем удерживания и разрешением, а также более информативных масс-спектров после электронной ионизации (ЭИ). Анализ состава экстрактов без дериватизации представлен малым количеством компонентов в сравнении с профилем состава с предварительной дериватизацией силилированием. Поэтому использовалась подготовка с предварительным введением силильных групп.

Для сравнительного анализа все хроматограммы приведены в одинаковых единицах по осям. Для того чтобы дериватирующий агент не учитывался, запись сигнала начиналась с 13,0 мин. Было обнаружено по 40–41 основных компонентов в каждом из трёх образцов мускуса кабарги. Полный перечень компонентов с временами выхода и площадями представлен в табл. 1–3.

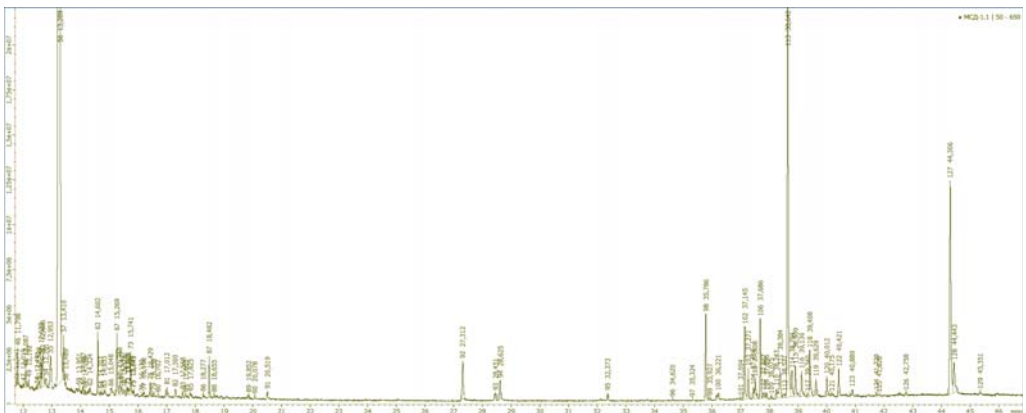


Рис. 1. Вид хроматограммы ГХ/МС анализа исследуемого образца мускуса кабарги сибирской.
Fig. 1. GC-MS chromatogram of a studied musk sample of Siberian musk deer.

Таблица 1. Состав основных соединений в образце мускуса № 1, полученных методом ГХ-МС после силилирования

Table 1. Composition of the main compounds in musk sample No. 1 obtained by GC-MS after silylation

| № | Название | Время, мин | Площадь, отн. ед. | Площадь, % | Вероятность (р) |
|----------------------------------|--|------------|-------------------|------------|-----------------|
| Органические кислоты | | | | | |
| 1 | Benzoic acid, TMS derivative | 13,77 | 35809992,25 | 3,6 | 55,48 |
| 2 | Benzeneacetic acid, TMS derivative | 14,83 | 120035235,71 | 11,9 | 98,42 |
| 3 | Succinic acid, 2-(2-chlorophenoxy)ethyl propyl ester | 14,96 | 1595317,47 | 0,2 | 30,5 |
| 4 | 3-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative | 19,75 | 2038570,24 | 0,2 | 54,19 |
| 5 | 4-Hydroxybenzeneacetic acid, 2TMS derivative | 21,28 | 1789451,58 | 0,2 | 93,2 |
| 6 | 5,7-Dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone | 33,25 | 1795160,79 | 0,2 | 48,1 |
| 7 | 3',4',5,7-Tetramethoxyflavone | 35,95 | 1293794,53 | 0,1 | 61,37 |
| 8 | D-Galactitol, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, anhydride with 1,2,3,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-β-D-galactofuranose | 40,76 | 3678040,79 | 0,4 | 63,7 |
| 9 | Retinoic acid, TMS derivative | 40,55 | 3218418,18 | 0,3 | 23,17 |
| Холестерины | | | | | |
| 10 | Lanost-8-ene-3β,7α-diol, 3-acetate | 44,40 | 2293124,03 | 0,2 | 82,91 |
| 11 | Cholesterol, TMS derivative | 45,76 | 164913139,85 | 16,4 | 72,57 |
| 12 | Cholestan-3-ol, (3β,5α)-, TMS derivative | 45,99 | 31708947,33 | 3,2 | 71,85 |
| Андрогены (андростероиды) | | | | | |
| 13 | 5β-Dihydrotestosterone, TMS derivative | 38,39 | 16258238,19 | 1,6 | 89 |
| 14 | Cetadiol, 2TMS derivative | 38,85 | 3699162,72 | 0,4 | 49,41 |
| 15 | Androstane-3,17-diol, (3β,5α,17β)-, 2TMS derivative | 38,98 | 53385280,76 | 5,3 | 34,32 |
| 16 | Androst-3-en-17-one, 3-(trimethylsilyloxy)-, (5β)- | 39,40 | 9055547,21 | 0,9 | 26,79 |
| 17 | Androst-5-en-16-one, 3-(trimethylsilyloxy)-, (3β)- | 39,54 | 4883368,28 | 0,5 | 69,92 |
| 18 | 5α-Androstan-3β-ol-17-one, TMS derivative | 39,76 | 5075065,19 | 0,5 | 39,44 |
| 19 | Androstane-3,17-dione, (5β)- | 39,85 | 7409682,79 | 0,7 | 57,37 |
| 20 | Androst-5-ene-3β,17β-diol, 2TMS derivative | 40,01 | 16824380,31 | 1,7 | 42 |
| 21 | 6β,19-Cycloandro-4-ene-3,17-dione | 41,47 | 12154238,53 | 1,2 | 53,03 |
| Жирные кислоты | | | | | |
| 22 | Nonanoic acid, TMS derivative | 15,86 | 22586367,07 | 2,2 | 69,99 |
| 23 | Pentanedioic acid, 2-(trimethylsilyloxy)-, bis(trimethylsilyl) ester | 16,18 | 3481847,37 | 0,3 | 46 |
| 24 | Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl ester | 16,42 | 20133210,92 | 2,0 | 73,64 |
| 25 | Myristic acid, TMS derivative | 25,80 | 3296273,15 | 0,3 | 85,75 |
| 26 | Palmitelaidic acid, TMS derivative | 29,89 | 2151501,77 | 0,2 | 44,45 |
| 27 | Palmitic acid, TMS derivative | 30,43 | 20368577,59 | 2,0 | 93,65 |
| 28 | Stearic acid, TMS derivative | 33,96 | 5331083,68 | 0,5 | 90,38 |
| 29 | Behenic acid, TMS derivative | 39,20 | 2916205,71 | 0,3 | 27,8 |

Продолжение Табл. 1
Table 1. Continuation

| № | Название | Время, мин | Площадь, отн. ед. | Площадь, % | Вероятность (р) |
|-------------------------------------|---|------------|-------------------|------------|-----------------|
| 30 | Lignoceric acid, TMS derivative | 41,37 | 2901372,88 | 0,3 | 77,94 |
| 31 | Heneicosanoic acid, TMS derivative | 37,68 | 1232972,55 | 0,1 | 43,19 |
| Прочие органические вещества | | | | | |
| 32 | Urea, 2TMS derivative | 13,66 | 379932052,75 | 37,8 | 93,34 |
| 33 | Levobunolol methylboronate | 31,42 | 1420456,68 | 0,1 | 38,25 |
| 34 | Hexadecane-1,2-diol, 2TMS derivative | 32,08 | 3976824,29 | 0,4 | 50,35 |
| 35 | 16-Methyl-heptadecane-1,2-diol, trimethylsilyl ether | 34,59 | 9470433,66 | 0,9 | 46,43 |
| 26 | 16-Methyl-heptadecane-1,2-diol, trimethylsilyl ether | 35,42 | 1497923,04 | 0,1 | 18,65 |
| 37 | Purin-2,6-dione, 1,3-dimethyl-8-2-3,4-dimethoxyphenylethenyl- | 36,08 | 3646638,80 | 0,4 | 51,72 |
| 38 | 1-Heneicosanol, TMS derivative | 36,47 | 20189962,70 | 2,0 | 26,38 |
| 39 | Purin-2,6-dione, 1,3-dimethyl-8-2-3,4-dimethoxyphenylethenyl- | 36,85 | 1078197,38 | 0,1 | 91,87 |
| 40 | 6-Hydroxy-4-(imidazol-1-ylmethyl)-7-methylchromen-2-one | 37,01 | 1863547,48 | 0,2 | 34,29 |

Таблица 2. Состав основных соединений в образце мускуса № 2, полученных методом ГХ-МС после силилирования

Table 2. Composition of the main compounds in musk sample No. 2 obtained by GC-MS after silylation

| № | Название | Время, мин | Площадь, отн. ед. | Площадь, % | Вероятность (р) |
|----------------------------------|---|------------|-------------------|------------|-----------------|
| Органические кислоты | | | | | |
| 1 | Benzoic acid, TMS derivative | 13,76 | 20830956,09 | 2,6 | 77,38 |
| 2 | Benzeneacetic acid, TMS derivative | 14,83 | 68023797,13 | 8,5 | 98,46 |
| 3 | 5,7-Dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone | 33,67 | 1783902,55 | 0,2 | 59,11 |
| 4 | D-Galactitol, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, anhydride with 1,2,3,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-β-D-galactofuranose | 40,74 | 3550515,70 | 0,4 | 16,78 |
| 5 | Retinoic acid, TMS derivative | 40,53 | 4563353,29 | 0,6 | 10,43 |
| Холестерины | | | | | |
| 6 | Benzoenaphth ^{2'} ,1':4,5indeno 1,2-bindol-2-ol, 1,2,3,4,4a,4b,5,6,6a, 7,14,14a,14b, 15,16,16a-hexadecahydro-4a,6a-dimethyl-, acetate (ester), 2S-(2α, 4α,4bβ,6αα,14aβ,14bα,16aβ)- | 42,10 | 5494046,38 | 0,7 | 82,35 |
| 7 | Cholest-2-ene, (5α)- | 42,35 | 8891354,07 | 1,1 | 21,4 |
| 8 | 5-β-cholestan-3α-ol, octanoate | 42,44 | 2463222,26 | 0,3 | 9,62 |
| 9 | Cholesterol, TMS derivative | 45,74 | 123928062,19 | 15,5 | 75,19 |
| 10 | Cholestan-3-ol, (3β,5α)-, TMS derivative | 45,97 | 27450236,21 | 3,4 | 69,81 |
| Андрогены (андростероиды) | | | | | |
| 11 | 5β-Dihydrotestosterone, TMS derivative | 38,38 | 16935380,52 | 2,1 | 83,99 |
| 12 | Cetadiol, 2TMS derivative | 38,83 | 3006046,92 | 0,4 | 13,98 |
| 13 | Androstane-3,17-diol, (3β,5α,17β)-, 2TMS derivative | 38,95 | 54430928,78 | 6,8 | 32,41 |

Продолжение Табл. 2
 Table 2. Continuation

| № | Название | Время, мин | Площадь, отн. ед. | Площадь, % | Вероятность (р) |
|-------------------------------------|--|------------|-------------------|------------|-----------------|
| 14 | Androst-3-en-17-one, 3-(trimethylsilyl)oxy-, (5β)- | 39,37 | 6564374,39 | 0,8 | 56,96 |
| 15 | Dehydroepiandrosterone, (3β)-, TMS derivative | 39,52 | 3737179,93 | 0,5 | 53,98 |
| 16 | 5α-Androstan-3β-ol-17-one, TMS derivative | 39,75 | 5068754,06 | 0,6 | 58,1 |
| 17 | Androstane-3,17-dione, (5β)- | 39,83 | 8268647,16 | 1,0 | 63,51 |
| 18 | Androst-5-ene-3β,17β-diol, 2TMS derivative | 39,99 | 21222990,46 | 2,7 | 51,04 |
| 19 | 5,19-Cyclo-5β-androst-6-ene-3,17-dione | 41,44 | 11850950,46 | 1,5 | 52,83 |
| Жирные кислоты | | | | | |
| 20 | Nonanoic acid, TMS derivative | 15,87 | 16656099,05 | 2,1 | 25,34 |
| 21 | Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl ester | 16,41 | 25050204,64 | 3,1 | 82,79 |
| 22 | Myristic acid, TMS derivative | 25,78 | 5273070,34 | 0,7 | 80,97 |
| 23 | Pentadecanoic acid, TMS derivative | 28,16 | 2592727,24 | 0,3 | 32,12 |
| 24 | Palmitelaic acid, TMS derivative | 29,87 | 6450039,45 | 0,8 | 71,65 |
| 25 | Palmitic acid, TMS derivative | 30,41 | 26099208,06 | 3,3 | 94,8 |
| 26 | Oleic Acid, (Z)-, TMS derivative | 33,53 | 4450107,85 | 0,6 | 45,73 |
| 27 | Stearic acid, TMS derivative | 33,94 | 8854456,25 | 1,1 | 92,45 |
| 28 | Arachidic acid, TMS derivative | 36,76 | 1301898,60 | 0,2 | 54,27 |
| 29 | 10-Undecenoic acid, TBDMS derivative | 36,98 | 1170083,07 | 0,1 | 20,46 |
| 30 | Heneicosanoic acid, TMS derivative | 37,66 | 5797924,32 | 0,7 | 64,35 |
| 31 | Behenic acid, TMS derivative | 39,18 | 3079885,26 | 0,4 | 61,9 |
| 32 | Lignoceric acid, TMS derivative | 41,35 | 4524495,37 | 0,6 | 61,12 |
| 33 | Pentanoic acid, 3-phenyl-2-propenyl ester | 43,02 | 3769150,57 | 0,5 | 13,89 |
| Прочие органические вещества | | | | | |
| 34 | Urea, 2TMS derivative | 13,64 | 243211107,88 | 30,5 | 93,04 |
| 35 | Hexadecane-1,2-diol, 2TMS derivative | 32,07 | 5071888,85 | 0,6 | 52,11 |
| 36 | 16-Methyl-heptadecane-1,2-diol, trimethylsilyl ether | 34,57 | 10083514,11 | 1,3 | 49,52 |
| 37 | Purin-2,6-dione, 1,3-dimethyl-8-2-3,4-dimethoxyphenylethenyl- | 35,94 | 3064489,00 | 0,4 | 33,24 |
| 38 | Purin-2,6-dione, 1,3-dimethyl-8-2-3,4-dimethoxyphenylethenyl- | 36,06 | 3218263,83 | 0,4 | 67,9 |
| 39 | 1-Heneicosanol, TMS derivative | 36,45 | 19742643,76 | 2,5 | 46,56 |
| 40 | Purin-2,6-dione, 1,3-dimethyl-8-2-3,4-dimethoxyphenylethenyl- | 36,84 | 442258,03 | 0,1 | 86,15 |

Таблица 3. Состав основных соединений в образце мускуса № 3, полученных методом ГХ-МС после силилирования

Table 3. Composition of the main compounds in musk sample No. 3 obtained by GC-MS after silylation

| № | Название | Время, мин | Площадь, отн. ед. | Площадь, % | Вероятность (р) |
|----------------------------------|---|------------|-------------------|------------|-----------------|
| Органические кислоты | | | | | |
| 1 | Benzoic acid, TMS derivative | 13,77 | 93083859,29 | 2,4 | 77,93 |
| 2 | Hexanoic acid, 2-(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester | 13,97 | 1761940,66 | 0,0 | 68,46 |
| 3 | Benzeneacetic acid, TMS derivative | 14,83 | 74081734,83 | 1,9 | 97,75 |
| 4 | 3-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative | 19,74 | 8717801,64 | 0,2 | 54,71 |
| 5 | 4-Hydroxybenzoic acid, 2TMS derivative | 21,06 | 5133980,42 | 0,1 | 47,9 |
| 6 | 4-Hydroxybenzeneacetic acid, 2TMS derivative | 21,28 | 8246166,66 | 0,2 | 96,03 |
| 7 | Phenaceturic acid, TBDMS derivative | 27,58 | 34220272,14 | 0,9 | 34,86 |
| 8 | Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-(trimethylsilyl)- | 37,85 | 2548069,03 | 0,1 | 15,6 |
| 9 | Retinoic acid, TMS derivative | 40,54 | 13919124,54 | 0,4 | 20,1 |
| Холестерины | | | | | |
| 10 | Cholesterol, TMS derivative | 45,76 | 318618443,57 | 8,3 | 75,46 |
| 11 | Cholestan-3-ol, (3 β ,5 α)-, TMS derivative | 45,98 | 96719557,39 | 2,5 | 56,46 |
| 12 | Cholest-7-en-3-ol, (3 β ,5 α)-, TMS derivative | 46,88 | 7447678,65 | 0,2 | 32,87 |
| Андрогены (андростероиды) | | | | | |
| 13 | Dehydroisoandrosterone acetate | 36,47 | 92401862,58 | 2,4 | 21,09 |
| 14 | Androstane-3,17-diol, (3 α ,5 β ,17 β)-, 2TMS derivative | 37,00 | 488452473,19 | 12,8 | 67,05 |
| 15 | Androstane-3,17-diol, (3 α ,5 α ,17 β)-, 2TMS derivative | 37,24 | 8375083,80 | 0,2 | 30,24 |
| 16 | Androstane-3,17-diol, (3 α ,5 α ,17 β)-, 2TMS derivative | 37,48 | 24050881,82 | 0,6 | 55,94 |
| 17 | Androstane-3,17-diol, (3 α ,5 β ,17 β)-, 2TMS derivative | 37,67 | 6344646,01 | 0,2 | 69,96 |
| 18 | Dehydroepiandrosterone, (3 β)-, TMS derivative | 38,36 | 12661668,12 | 0,3 | 27,61 |
| 19 | 3-Hydroxyandrostane-17-one o-methyloxime, (3 α ,5 β)-, TMS derivative | 38,60 | 409497725,43 | 10,7 | 13,8 |
| 20 | Etiocholanone, TMS derivative | 38,81 | 689144839,80 | 18,0 | 55,94 |
| 21 | Androstane-3,17-diol, (3 β ,5 α ,17 β)-, 2TMS derivative | 38,96 | 160015715,56 | 4,2 | 40,34 |
| 22 | Androstane-3,11,17-triol, (3 α ,5 β ,11 α ,17 β)-, 3TMS derivative | 39,10 | 29053174,60 | 0,8 | 61,45 |
| 23 | 3-Hydroxyandrostane-17-one o-methyloxime, (3 α ,5 α)-, TMS derivative | 39,39 | 55302860,26 | 1,4 | 16,66 |
| 24 | Dehydroepiandrosterone, (3 β)-, TMS derivative | 39,53 | 26189854,60 | 0,7 | 55,1 |
| 25 | 5 α -Androstan-3 β -ol-17-one, TMS derivative | 39,76 | 25554397,20 | 0,7 | 75,79 |
| 26 | Androst-5-ene-3 β ,17 β -diol, 2TMS derivative | 40,01 | 16661919,14 | 0,4 | 28,97 |
| 27 | Cyclohexene, 1,5,5-trimethyl-6-(2-propenylidene)- | 40,14 | 3123897,97 | 0,1 | 53,41 |
| 28 | Pregnane-3,17,20,21-tetrol, (3 β ,5 α ,20R)-, 4TMS derivative | 40,45 | 13278485,74 | 0,3 | 13,58 |

Продолжение Табл. 3
 Table 3. Continuation

| № | Название | Время, мин | Площадь, отн. ед. | Площадь, % | Вероятность (p) |
|-------------------------------------|---|------------|-------------------|------------|-----------------|
| 29 | Androstane-3,11,17-triol, (3 α ,5 β ,11 α ,17 β)-, 3TMS derivative | 40,67 | 8363831,73 | 0,2 | 39,62 |
| Жирные кислоты | | | | | |
| 30 | 2-Ketooisocaproic acid, TBDMS derivative | 14,96 | 50097317,43 | 1,3 | 8,97 |
| 31 | 10-Undecynoic acid, TMS derivative | 15,84 | 27517891,06 | 0,7 | 16,96 |
| 32 | Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl ester | 16,42 | 34488941,84 | 0,9 | 83,3 |
| 33 | Pentanoic acid, 3-methyl-2-(trimethylsilyloxy-, trimethylsilyl ester | 16,70 | 4830033,03 | 0,1 | 49,49 |
| 34 | α -Hydroxybutyric acid, trimethylsilyl ester, acetate | 17,25 | 7671018,28 | 0,2 | 13,9 |
| 35 | Hippuric acid, TMS derivative | 26,58 | 83874217,12 | 2,2 | 97,88 |
| 36 | Palmitic acid, TMS derivative | 30,41 | 13988566,10 | 0,4 | 97,05 |
| 37 | Stearic acid, TMS derivative | 33,95 | 4923476,25 | 0,1 | 91,45 |
| 38 | Arachidic acid, TMS derivative | 36,77 | 2528230,60 | 0,1 | 75,06 |
| 39 | Behenic acid, TMS derivative | 39,19 | 8535925,79 | 0,2 | 92,72 |
| 40 | Lignoceric acid, TMS derivative | 41,36 | 10705358,79 | 0,3 | 92,8 |
| Прочие органические вещества | | | | | |
| 41 | Urea, 2TMS derivative | 13,68 | 838703369,17 | 22,0 | 92,31 |

В результате исследования химического состава мускуса было выделено пять основных кластеров аналитов:

1) андрогены (андростероиды) — группа стероидных половых гормонов, которая считается основным и самым важным кластером в оценке биологической активности мускуса;

2) холестерин — вторая мажорная фракция, необходимы для выработки витамина D, синтеза надпочечниками различных стероидных гормонов (включая кортизол, альдостерон, половые гормоны: эстрогены, прогестерон, тестостерон), желчных кислот;

3) жирные кислоты (ЖК) — алифатические одноосновные длинноцепочечные насыщенные и ненасыщенные карбоновые кислоты, выполняющие в организме очень важные функции — пластическую и регуляторную;

4) органические кислоты, куда включены все низкомолекулярные соединения, воз-

можно отщепления кислот от более крупных молекул;

5) прочие органические вещества — побочные продукты реакции между веществами во время дериватизации, представляющие незначительный интерес.

Выявлены следующие основные действующие компоненты проанализированных образцов мускуса: андрогены (Etiocholanone; Androstane-3,17-diol, (3 α ,5 β ,17 β); Androstane-3,17-diol, (3 β ,5 α ,17 β)), холестерин, ретиноевая кислота (метаболит витамина A₁).

Далее было проведено сравнение общего содержания компонентов в полном ионном токе. Для удобства восприятия данные нормированы на образец мускуса, полученный от животных группы 1. В анализе общего содержания компонентов образец № 1 мускуса принимается за 100%, остальные образцы нормируются относительно него. В образце № 2 мускуса (полученном при вольерном содержании и кормлении

кабарги стандартным рационом) доля всех компонентов снизилась на 24,0% и составила 76%. Однако в образце № 3 мускуса (при кормлении кабарги оптимизированным рационом с добавлением премиксов, разработанных в НЦБМТ) отмечалось увеличение содержания компонентов мускуса на 3,4% в сравнении с природным образцом № 1. Это может говорить об эффективности использования кормовых добавок и возможности быстрого восстановления природного состава выделений препуциальной железы самцов кабарги при оптимизации кормления животных.

Для каждого образца были построены диаграммы по содержанию основных фракций относительно общего количества идентифицированных веществ (рис. 2). Из диаграмм видно, что классы аналитов, предположительно отвечающие за биологические эффекты мускуса (андрогены, холестерин и жирные кислоты), составляют в сумме: образец № 1 — 40,9%; образец № 2 — 49,8%; образец № 3 — 71,7%. Это

свидетельствует о наличии тенденции изменения органического состава веществ, секретируемых мускусной железой самцов кабарги при вольерном содержании.

В образце № 1 мускуса установлено наличие большего количества органических кислот и соединений, но меньшее количество холестерина и андрогенов.

Относительное содержание компонентов кластера андрогенов в образце № 3 мускуса составило 54,0% (рис. 2). Этот образец был получен от самцов кабарги, содержащихся в вольерных условиях и получавших рацион с кормовой добавкой-премиксом, содержащим биологически активные компоненты, оказывающие регуляторное воздействие на физиолого-биохимические процессы в организме животных. Перечень этих компонентов имел высокое разнообразие и содержал следующие растительные компоненты: жмых копеечника забытого (*Hedysarum neglectum*), экстракты лимонника китайского (*Schisandra chinensis*), левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*),

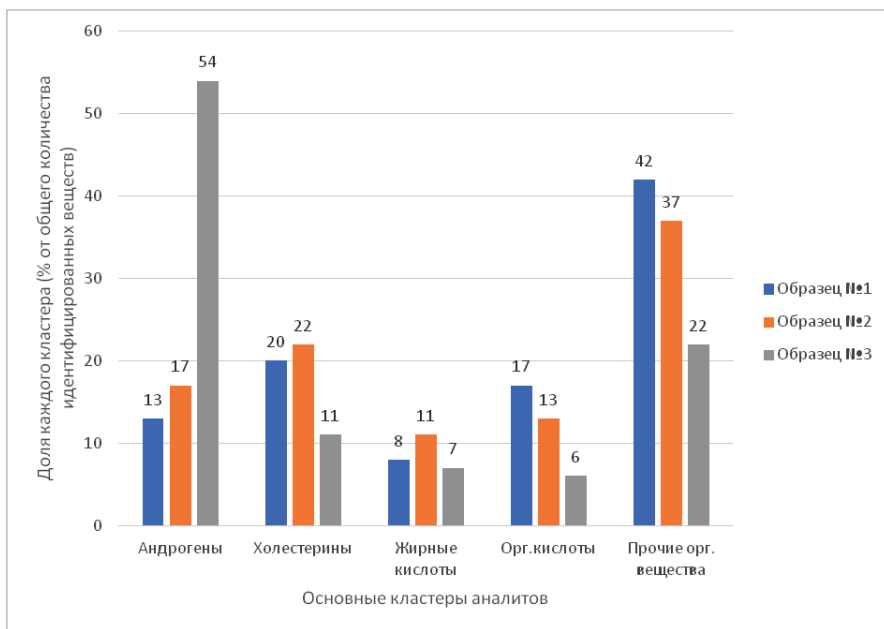


Рис. 2. Содержание основных кластеров аналитов в мускусе кабарги сибирской.

Fig. 2. Content of the main analyte clusters in the musk of Siberian musk deer.

гвоздичного дерева (*Syzygium aromaticum*), алтея лекарственного (*Althaea officinalis*), иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis*), эфирное масло рододендрона даурского (*Rhododendron dauricum*), уснеевая кислота, лактулоза, инулин. Результаты нашего исследования показывают, что расширение спектра питания кабарги, содержащейся в искусственных условиях, премиксами и добавками до уровня разнообразия состава кормов, потребляемых животными в естественной среде, непосредственно влияет на содержание биологически активных компонентов секрета препуциальной железы самцов (мускуса). При этом следует отметить, что фракция андростероидов в образце № 3 мускуса занимает основную часть от общего состава БАВ, при этом одновременно наблюдается уменьшение количества органических кислот и прочих органических соединений. Такая специфика химического состава увеличивает биологическую ценность полученного мускуса.

Сравнение проанализированных образцов мускуса по содержанию кластеров выделенных соединений представлено на рис. 3. Образец № 1 принимался за 100%, остальные образцы нормировались относительно него. Наиболее значимое отличие между образцами наблюдается в составе андрогенового кластера анализов. Для образца № 3 мускуса данная фракция увеличивалась относительно других проб более чем в 2,5 раза. При этом в образце № 3 мускуса отмечено также увеличение количества жирных кислот на 38% и одновременно снижение содержания органических кислот на 53% (относительно образца сравнения № 1).

Вещества андрогенового кластера являются наиболее биологически активным компонентом мускуса, поэтому их разнообразие и количество представляет наибольший интерес. На рис. 4 представлен подробный относительный анализ содержания андрогенов в образце № 3 мускуса. Больше

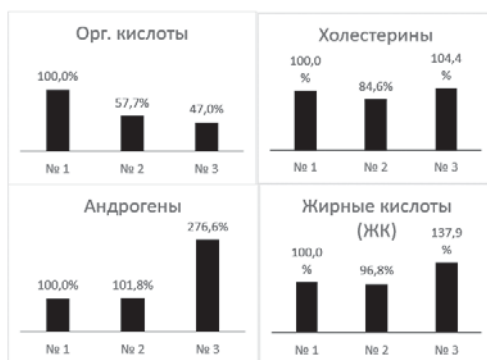


Рис. 3. Сравнение по группам выделенных соединений из препуциальной железы методом ГХ-МС. Общий вклад компонентов образца № 1 мускуса принимается за 100%.

Fig. 3. Comparison by groups of compounds isolated from the preputial gland by GC-MS. The total contribution of musk sample No. 1 components is taken as 100%.

всего в пробе выявлено TMS производного этиохоланона — 33,3%, в небольших количествах присутствуют его изомеры — 5 α -Androstan-3 β -ol-17-one — 1,2%. На втором месте по количеству два андростандиола: androstane-3,17-diol,(3 α ,5 β ,17 β) — 23,9% и androstane-3,17-diol,(3 β ,5 α ,17 β) — 7,7%.

При сравнении качественного состава и количественного содержания андростероидных соединений данной пробы с образцом № 1 мускуса оказалось, что основным компонентом в образце № 1 также является androstan-17-one,3-hydroxy-,(3 α ,5 β), или этиохоланон. Минорными компонентами во всех трёх образцах стали Androstane-3,17-diol,(3 α ,5 α ,17 β); 5 α -Androstan-3 β -ol-17-one; Androst-5-en-16-one,3-(trimethylsilyl)oxy-,(3 β)-. Их содержание в пробах не превышало 5,0%.

Выводы

Таким образом, на основании вышеизложенного можно сделать следующие выводы:

1) условия обитания и особенности диеты животных напрямую влияют на качественный состав выделений препуциальной железы (мускуса) самцов кабарги;

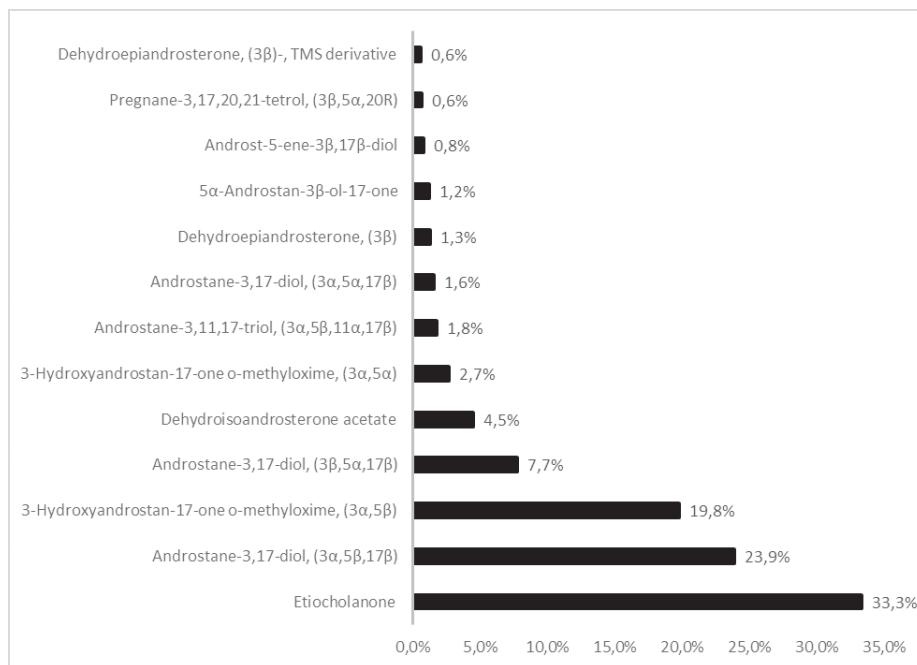


Рис. 4. Относительный анализ содержания андрогенов для образца № 3 мускуса.

Fig. 4. Relative analysis of androgen content for musk sample No. 3.

2) при анализе мускуса, полученного прижизненно путём экстракции у самцов кабарги при разных вариантах питания, идентифицировано 40–41 химическое соединение из пяти основных кластеров аналитов (андрогены, холестерины, жирные кислоты, органические кислоты, прочие органические вещества);

3) основные действующие компоненты проанализированных образцов мускуса: андрогены (Etiocholanone; Androstane-3,17-diol,(3α,5β,17β); Androstane-3,17-diol,(3β,5α,17β)), холестерин, ретиноевая кислота (метаболит витамина A₁);

4) химический состав мускуса, полученного от самцов кабарги, содержащихся

в вольерных условиях и получавших экспериментальный рацион и кормовую добавку-премикс, содержит большее количество и качественное разнообразие компонентов из фракции андростероидов, при этом одновременно наблюдается уменьшение содержания органических кислот и прочих органических веществ;

5) оптимизация диеты животных путём расширения спектра поедаемых кормов за счёт добавления физиологически значимых компонентов приводит к улучшению качественного состава биологически активных веществ (мускуса), получаемых от самцов кабарги в вольерных условиях содержания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Камбалин В.С. Динамические процессы в численности кабарги. *Биосферное хозяйство: теория и практика*. 2021;11(40):24–30. [Kambalin V.S. Dinamicheskie protsessy v chislennosti kabargi [Dynamic processes in the abundance of musk deer]. *Biosfernoe khozyaystvo: teoriya i praktika* [Biosphere economy: theory and practice]. 2021;11(40):24–30. (In Russian)].
2. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Люблинский С.Л., Гасанов М.Т., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О.

- Источники сырья новой биоактивной добавки к пище для коррекции эректильной дисфункции. *Биомедицина*. 2018;(1):40–49. [Karkischenko V.N., Dulya M.S., Lyublinskij S.L., Gasanov M.T., Karanadze G.D., Revyakin A.O. Istochniki syr'ya novoy bioaktivnoy dobavki k pishche dlya korrektsii erektil'noy disfunktsii [Raw material sources of a new bioactive food supplement for erectile dysfunction correction]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2018;1:40–49. (In Russian)].
- Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л. Анализ биологически активных соединений мускуса кабарги (*Moschus moschiferus*) методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. *Биомедицина*. 2018;(1):19–39. [Karkischenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskij S.L. Analiz biologicheski aktivnykh soedineniy muskusa kabargi (*Moschus moschiferus*) metodom gazovoy khromatografii s mass-selektivnym detektorom [Analysis of biologically active compounds of musk deer (*Moschus moschiferus*) by gas chromatography with a mass-selective detector]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2018;1:19–39. (In Russian)].
 - Копытько Я.Ф., Цыбулько Н.С. Летучие компоненты *Moschus moschiferus* настойки гомеопатической матричной. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2019;22(3):31–36. [Kopyt'ko Ya.F., Cybul'ko N.S. Letuchie komponenty *Moschus moschiferus* nastoyki gomeopaticheskoy matrichnoy [Volatile components of *Moschus moschiferus* homeopathic matrix tincture]. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii [Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry]*. 2019;22(3):31–36. (In Russian)]. DOI: 10.29296/25877313-2019-03-05.
 - Приходько В.И. Динамика численности кабарги (*Moschus moschiferus* L.) в России. *Вестник охотоведения*. 2018;15(1):26–32. [Prihod'ko V.I. Dinamika chislennosti kabargi (*Moschus moschiferus* L.) v Rossii [Population dynamics of musk deer (*Moschus moschiferus* L.) in Russia]. *Vestnik okhotovedeniya [Bulletin of hunting science]*. 2018;15(1):26–32. (In Russian)].
 - Приходько В.И. *Кабарга: ресурсы, сохранение вида в России*. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2021:203. [Prihod'ko V.I. *Kabarga: resursy, sokhranenie vida v Rossii [Musk deer: resources, conservation of the species in Russia]*. Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ., 2021:203. (In Russian)].
 - Приходько В.И. *Разведение кабарги. Научно-практические рекомендации*. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013:142. [Prihod'ko V.I. *Razvedenie kabargi. Nauchno-prakticheskie rekomendatsii [Breeding of musk deer. Scientific and practical recommendations]*. Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ., 2013:142. (In Russian)].
 - Morishita S., Mishima Y., Shoji M. Pharmacological proper-ties of musk. *Gen. Pharmacol.* 1987;18(3):253–261. DOI: 10.1016/0306-3623(87)90008-5.
 - Nyambayar B., Mix H., Tsytulina K. *Moschus moschiferus*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2015:e.T13897A61977573. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T13897A61977573.en>.
 - Ly S., Lei Z., Yan G., Shah S.A., Ahmed S., Sun T. Chemical compositions and pharmacological activities of natural musk (*Moschus*) and artificial musk: A review. *J. Ethnopharmacol.* 2022;284:114799. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114799.
 - Tang Z.-S., Liu Y.-R., Lv Y., Duan J.-A., Chen S.-Z., Sun J., Song Z.-X., Wu X.-M., Liu L. Quality markers of animal medicinal materials: Correlative analysis of musk reveals distinct metabolic changes induced by multiple factors. *Phytomedicine*. 2018;44:258–269. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.03.008.
 - Wang J., Zheng Q., Xia C., Li Y., Zhou M., Sheng Y., Weladji R.B., Meng X. Seasonal reproduction of northernmost endangered forest musk deer (*Moschus berezovskii*) in China and the synchronization with climatic conditions. *Czech J. Anim. Sci.* 2021;66:46–54. DOI: 10.17221/202/2020-CJAS.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Зубалий Анастасия Михайловна*, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: amzubaliy@gmail.com

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

Anastasiia M. Zubalii, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: amzubaliy@gmail.com

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

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

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

Хвостов Даниил Владиславович, к.т.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН;
e-mail: d.hvostov@fneps.ru

Daniil V. Khvostov, Cand. Sci. (Tech.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: d.hvostov@fneps.ru

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

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

Огнев Сергей Валерьевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ogon07@rambler.ru

Sergey V. Ognev, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ogon07@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-39-47>



АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ БАЗОВЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД МИНИ-ПИГОВ, ПЕРЕНЁСШИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ НАГРУЗКИ

Н.В. Станкова*, О.В. Алимкина, И.А. Помыткин, В.Н. Каркищенко

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

Смоделированы предельные физические нагрузки («работа до отказа») на нетренированных мини-пигах. При исследовании общего клинического анализа крови, измерении лактата и проведении общего клинического анализа мочи были выявлены изменения, схожие с таковыми у человека, перенёсшего экстремальное состояние.

Ключевые слова: мини-пиг, физические нагрузки, биологические среды

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания «Биомоделирование и изучение механизмов дисфункций при предельных (истощающих) физических нагрузках спортсменов и спецконтингентов с поиском путей их коррекции» (шифр: «Лидер-2021»).

Для цитирования: Станкова Н.В., Алимкина О.В., Помыткин И.А., Каркищенко В.Н. Анализ изменений базовых показателей биологических сред мини-пигов, перенёсших экстремальные физические нагрузки. *Биомедицина*. 2022;18(4):39–47. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-39-47>

Поступила 10.10.2022

Принята после доработки 07.11.2022

Опубликована 10.12.2022

ANALYSIS OF VARIATIONS IN THE BASIC INDICATORS OF MINI PIGS UNDER EXTREME PHYSICAL EXERTION

Nataliia V. Stankova*, Oksana V. Alimkina, Igor A. Pomytkin, Vladislav N. Karkischenko

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

Extreme physical exertion (work to failure) was simulated in untrained mini pigs. The results of complete blood tests, lactate measurements and clinical urine analysis revealed variations in the basic parameters of animals similar to those observed in people after extreme exertion.

Keywords: mini pig, physical activity, basic indicators

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

Funding: the work was carried out within the framework of the State task “Biomodeling and study of the mechanisms of dysfunctions during extreme (exhausting) physical loads of athletes and special contingents with the search for ways to correct them” (code: “Leader-2021”).

For citation: Stankova N.V., Alimkina O.V., Pomytkin I.A., Karkischenko V.N. Analysis of Variations in the Basic Indicators of Mini Pigs under Extreme Physical Exertion. *Journal Biomed*. 2022;18(4):39–47. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-39-47>

Submitted 10.10.2022

Revised 07.11.2022

Published 10.12.2022

Введение

Характеристика воздействия на организм человека физических нагрузок разной мощности используется при изучении процессов адаптации организма к физическим нагрузкам и применяется в клинической спортивной и восстановительной медицине. Ввиду этого исследование процесса приспособления организма к физическим нагрузкам различной мощности достаточно актуально как в прикладном, так и в научном аспекте [5].

В решении данной проблемы ведущая роль принадлежит экспериментальным исследованиям, направленным на раскрытие процессов адаптации организма к физическим нагрузкам, пределов адаптационных возможностей отдельных систем, органов и организма в целом. Поскольку в процессе адаптации не появляются новые физиологические системы и механизмы их регуляции, а лишь мобилизуются скрытые возможности (резервы), то в настоящее время одной из главных задач физиологии труда и спорта является выявление физиологических резервов и своевременная оценка состояния тренированности (работоспособности) организма. С этой целью уже разработаны различные методы оценки функционального состояния организма и характера протекания в нём физиологических процессов, среди которых значительное место занимает исследование крови [1].

Биомоделирование экстремальных физических нагрузок на мелких лабораторных животных имеет ограничения из-за больших различий в скорости метаболизма этих животных и человека. Мини-пиги представляют собой наиболее релевантную человеку биомодель с этой точки зрения.

В нашем исследовании была смоделирована предельная физическая нагрузка («работа до отказа») на нетренированных мини-пигах с **целью** выявить изменения в биологических средах организма (кровь и моча), характерные для нетренированного челове-

ка, перенёсшего экстремальное состояние. Результаты данного эксперимента легли в основу дальнейшего изучения механизмов адаптации и восстановления организма.

Материалы и методы

Животные

Светлогорские мини-свиньи самцы (n=8), возраст — 4–6 мес., средняя масса тела — 15,6±0,9 кг. Животные содержались в одном помещении, в групповых станках по 4 головы, с оптимальными параметрами микроклимата и освещения для содержания крупных лабораторных животных. Использовался стандартный тип кормления для мини-свиней — полнорационный комбикорм ПК-55 (норма 400 г в сутки на голову), поение без ограничений. В день проведения теста животных не кормили, доступ к воде не ограничивали. Исследования проводились в соответствии с Приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», а также Директивой ЕС 2010/63/ЕС о защите животных, используемых в научных целях. Все эксперименты одобрены биоэтической комиссией НЦБМТ ФМБА России [3].

Исследования крови

Кровь отбирали из краниальной поллой вены до бега (фон), сразу после нагрузки, через 30 мин, 1, 6, 12 и 24 ч. Методика описана в работе [10]. Обработка полученной крови проводилась на автоматическом гематологическом анализаторе Mindray BC-3600 (Китай). Лейкоцитарную формулу крови определяли морфологически, окрашивание мазков осуществлялось с помощью краски Leukodif 200 (Чехия), микрофотографирование производилось на микроскопе МТ4300L (Япония). Лактат определяли на портативном анализаторе крови Accutrend Plus (Швейцария). Мочу исследовали с помощью тест-полосок Uriscan 11 strip (Корея), а также микрофотографировали осадок после центрифугирования.

Тест бега мини-свиней на тредбане до отказа

Тест производился с использованием беговой дорожки для животных типа Pet Treadmill wikiRUN № 3 с защитной сеткой (Россия), адаптированный для мини-свиней [8]. Для принуждения животного к бегу до отказа использовали электростимуляцию. Специальная панель с электродами была установлена в конце беговой дорожки. Напряжение 220 В подавалось на ручной трансформаторный блок «ЛАТР», где понижалось до 40–60 В, в зависимости от индивидуальной чувствительности животного, а затем подавалось на электроды. Животное получало разряд во время прекращения движения и прикосновения к электродам. Скорость движения беговой дорожки во время тестирования — 6 км/ч. Регистрируемый показатель — время бега [9, 11]. Тестирование проводили утром в специальном, проветриваемом помещении при температуре 20 °С.

Статистическая обработка

Данные представлены как среднее ± ошибка среднего. Нормальность распределения оценивали с использованием критерия Колмогорова—Смирнова. Статистическую значимость определяли

с помощью однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями (one-way RM ANOVA) с последующим тестом Даннетта (Dunnett's test) для множественного сравнения между группами. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Результаты и их обсуждение

Поскольку наибольшее количество исследований о влиянии физической нагрузки на периферическую кровь было посвящено изучению лейкоцитов, мы изучили морфологический состав крови мини-пигов до и после физической нагрузки (таблица).

Работа до отказа вызвала статистически значимое повышение уровня лейкоцитов на 26% через 6 ч после нагрузки ($p < 0,001$) с возвращением к исходному донагрузочному уровню через 24 ч. Через 12 ч после нагрузки наблюдалось кратковременное падение уровня тромбоцитов на 29% ($p < 0,05$). При этом однофакторный анализ с повторными измерениями не выявил статистически значимых различий в течение всего периода наблюдений в отношении остальных измеренных параметров, включая количе-

Таблица. Морфологический состав крови мини-пигов до и после физической нагрузки
Table. Morphological composition of the blood of mini-pigs before and after physical activity

| Параметры | До нагрузки | Сразу после нагрузки | Период | | | | |
|-------------------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|--------------|------------|-------------|
| | | | 30 мин | 1 ч | 6 ч | 12 ч | 24 ч |
| Лейкоциты, $10^9/л$ | 12,5±0,77 | 11,7±0,60 | 14,4±1,19 | 14,6±1,01 | 15,8±0,78*** | 14,1±0,67 | 12,1±0,51 |
| Эритроциты, $10^{12}/л$ | 8,2±0,11 | 8,0±0,11 | 7,8±0,15 | 7,9±0,09 | 7,8±0,13 | 7,7±0,13 | 7,6±0,10 |
| Тромбоциты, $10^9/л$ | 385,3±32,13 | 393,3±32,12 | 370,4±37,46 | 376,5±38,29 | 323,3±31,50 | 274±22,75* | 345,8±26,11 |
| Гемоглобин, $10^{12}/л$ | 152,6±2,92 | 148±3,38 | 144,4±4,52 | 146,4±3,77 | 143,9±4,15 | 142,4±4,59 | 140,5±4,06 |
| Гематокрит, % | 44,8±0,59 | 43,4±0,81 | 41,8±1,07 | 42,7±0,81 | 42,3±1,08 | 41,6±1,12 | 40,4±0,95 |
| СОЭ | 1,5±0,27 | 1,1±0,13 | 1,3±0,25 | 1,1±0,13 | 2,3±0,49 | 2,4±0,84 | 2,3±0,77 |

Примечание: статистически значимые отличия от значения до нагрузки: * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$.
Note: statistically significant differences from the value before the load: * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$.

ство эритроцитов, уровень гемоглобина, а также значение гематокрита и СОЭ.

Повышение уровня лейкоцитов после нагрузки у мини-пигов совпадает с известным эффектом у человека. Появление лейкоцитоза после мышечной деятельности установлено в работах [12, 13]. Первым исследователем, установившим закономерности изменения количества лейкоцитов под непосредственным влиянием физической нагрузки, был А.П. Егоров (1926). Он впервые дал качественную и количественную характеристику изменениям лейкоцитов и выделил три фазы лейкоцитоза.

Первая фаза (лимфоцитарная) возникает после относительно небольшой работы. Она характеризуется незначительным лейкоцитозом ($8-12 \times 10^9/\text{л}$), снижением относительного количества нейтрофилов, абсолютным и относительным увеличением количества лимфоцитов и относительным уменьшением количества эозинофилов. Сущность возникновения 1-й фазы заключается в перераспределении лейкоцитов в кровеносном русле и их вымывании из селезенки.

Вторая фаза (нейтрофильная) появляется после сравнительно большой работы. Она характеризуется большим увеличением количества лейкоцитов ($16-18 \times 10^9/\text{л}$) по сравнению с первой фазой, резким увеличением количества нейтрофилов со сдвигом влево, уменьшением количества лимфоцитов и эозинофилов.

Третья фаза (интоксикационная) протекает по двум типам: регенеративному и дегенеративному. При регенеративном типе происходит значительное увеличение количества лейкоцитов ($20-50 \times 10^9/\text{л}$), увеличение количества нейтрофилов со сдвигом влево, уменьшение количества лимфоцитов (1%), полное исчезновение эозинофилов. Дегенеративный же тип характеризуется хотя и менее выраженным лейкоцитозом ($10-15 \times 10^9/\text{л}$), но более резким сдвигом нейтрофилов влево, абсолютной лимфо-

и эозинопенией и появлением патологических форм лейкоцитов. Интоксикационная фаза лейкоцитоза свидетельствует о крайней чрезмерности нагрузки [6]. Причиной 2-й и 3-й фаз является выход лейкоцитов из костного мозга, что доказывается появлением юных форм лейкоцитов и появлением патологических форм.

Однако не всегда лимфоцитарная фаза переходит в нейтрофильную. Так, у хорошо физически подготовленных людей даже после значительной нагрузки такого перехода не наблюдается. Это свидетельствует о достаточно высокой приспособленности человека к выполнению нагрузки.

Таким образом, появление в периферической крови лимфоцитарной фазы лейкоцитоза в ответ на значительную нагрузку является положительным прогностическим признаком высокого функционального состояния человека, и наоборот, появление нейтрофильной или интоксикационной фазы после относительно небольшой нагрузки свидетельствует о его недостаточной подготовленности к выполнению работы. В то же время отсутствие изменений в ответ на физическую нагрузку относительного количества форменных элементов в лейкоцитарной формуле следует считать либо признаком плохой приспособляемости организма к физическим нагрузкам, либо чрезмерностью физического напряжения для данного индивидуума [2].

В ранних исследованиях нами было показано, что под воздействием физической нагрузки происходит увеличение общего количества лейкоцитов с одновременной тенденцией к снижению таких показателей, как общее количество эритроцитов, гемоглобин, гематокрит и общее количество тромбоцитов [4]. В данном исследовании была протестирована новая выборка животных с увеличением времени наблюдений до 24 ч.

При обследовании спортсменов разных видов спорта установлено,

что под влиянием физической нагрузки происходит увеличение количества эритроцитов и гемоглобина. Некоторые авторы считают, что увеличение этих показателей происходит за счёт выхода крови из депо, а также сгущения крови из-за

дегидратации. Эта реакция расценивается как показатель хорошей подготовленности человека к физической нагрузке.

Проводя аналогию с данными по человеку, полученные нами результаты указывают на тяжёлую физическую нагрузку и непод-

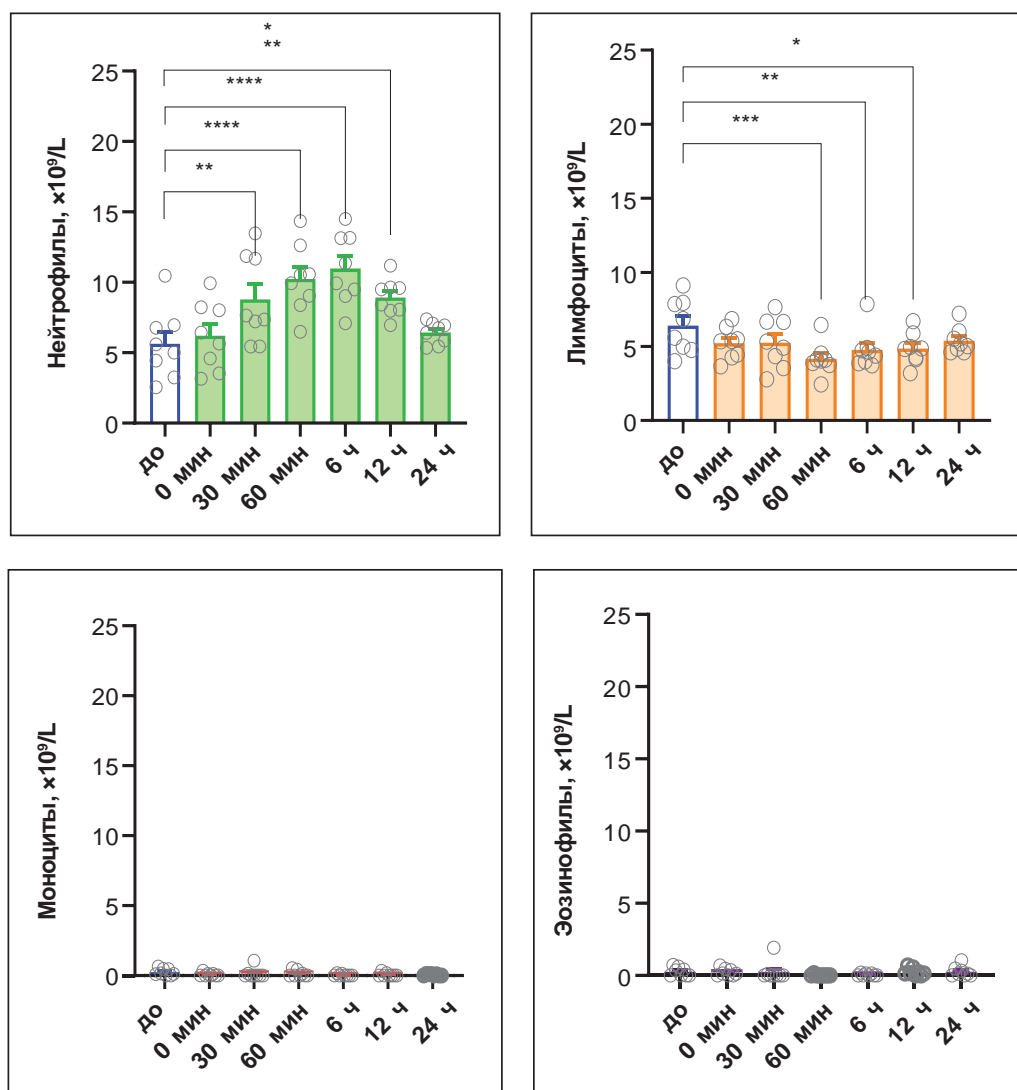


Рис. 1. Изменения лейкоцитарной фракции крови мини-пигов до и после физической нагрузки.

Примечание: показаны сравнения с показателями «до нагрузки»: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$.

Fig. 1. Variations in the leukocyte fraction of mini-pig blood before and after physical activity.

Note: comparisons are shown with the indicators "before loading": * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$; **** — $p < 0.0001$.

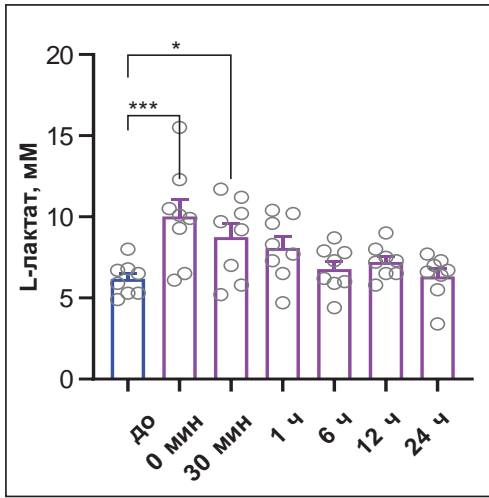


Рис. 2. Изменения уровня лактата в крови мини-пигов до и после физической нагрузки.

Примечание: показаны сравнения с показателями «до нагрузки»: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

Fig. 2. Variations in the lactate level in the blood of mini-pigs before and after physical activity.

Note: comparisons are shown with the indicators "before loading": * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

готовленность организма мини-пигов к выполнению данной мышечной работы.

Для того чтобы выяснить, какой фазе лейкоцитоза по Егорову соответствует работа до отказа у мини-пигов в настоящем эксперименте, мы исследовали влияние физической нагрузки на состав отдельных фракций лейкоцитов.

На рис. 1 видно, что происходит резкое нарастание нейтрофилов через 30 мин после бега, указывающее на возникновение 2-й фазы лейкоцитоза (нейтрофильная фаза), что позволяет нам сделать вывод о тяжести физической нагрузки животных. При этом значимо уменьшается количество лимфоцитов. К фоновым значениям показатели возвращаются к 24 ч после бега.

Количество эозинофилов и моноцитов остаётся практически неизменно на протяжении всего эксперимента, статистически значимых изменений нет. Это может свидетельствовать о том, что в процессе экс-

перимента не удалось достигнуть 3-й фазы лейкоцитоза (интоксикационной).

Для того чтобы оценить влияние физической нагрузки «до отказа» у мини-пигов на метаболизм, мы исследовали изменение во времени уровня лактата в плазме до и после физической нагрузки.

Работа до «отказа» вызвала статистически значимое увеличение концентрации лактата в крови мини-пигов на 60% к окончанию нагрузки ($p < 0,001$) по сравнению с исходным донагрузочным уровнем. Через 30 мин после окончания нагрузки уровень лактата всё ещё превышал исходный ($p < 0,05$) на 30%, но уже через 1 ч не отличался от исходного ($p > 0,05$). Эти результаты аналогичны обычному наблюдаемым у человека.

Уровень тренированности оценивается по изменению концентрации лактата в крови при выполнении предельной физической нагрузки. О более высоком уровне тренированности свидетельствуют меньшее накопление лактата (по сравнению с нетренированными) при выполнении нагрузки, что связано с увеличением доли аэробных механизмов в энергообеспечении этой работы; меньшее увеличение содержания лактата в крови при возрастании мощности работы, увеличение скорости утилизации лактата в период восстановления после физической нагрузки.

Накопление лактата, естественно-го для анаэробного гликолиза вещества, в плазме свидетельствует об истощении окислительного метаболического потенциала вследствие возрастания энергетических потребностей. Гликолитический механизм ресинтеза АТФ в скелетных мышцах заканчивается образованием молочной кислоты, которая затем поступает в кровь. Выход её в кровь после прекращения физической нагрузки происходит постепенно, достигая максимума на 3–7-й мин после окончания физической нагрузки. Содержание молочной кислоты в крови существенно возрастает при выполнении интенсивной

физической работы. При этом накопление её в крови совпадает с усиленным образованием в мышцах. Незначительные концентрации молочной кислоты в крови после выполнения максимальной работы свидетельствуют о более высоком уровне тренированности при хорошем спортивном результате или о большей метаболической ёмкости гликолиза, большей устойчивости его ферментов к смещению рН в кислую сторону. Таким образом, изменение концентрации молочной кислоты в крови после выполнения определённой физической нагрузки связано с состоянием тренированности спортсмена. По изменению её содержания в крови определяют анаэробные гликолитические возможности организма, что важно при отборе спортсменов, развитии их двигательных качеств, контроле тренировочных нагрузок и хода процессов восстановления организма [10].

В нашем исследовании уровень лактата достоверно увеличивался в первые минуты и до полчаса после нагрузки, что коррелирует с временным интервалом увеличения его количества в крови нетренированных людей. Таким образом, биомоделирование экстремальной физической нагрузки у мини-пигов приводит к изменениям в биохимическом и клеточном составе крови, сходным с наблюдаемыми у человека.

Кроме того, для оценки влияния физической нагрузки «до отказа» у мини-пигов на метаболизм мы исследовали химический состав мочи.

Фоновые показатели мочи до нагрузки у животных были в пределах физиологических норм, соответствовали референсным значениям, взятым из литературы: плотность — 1,02–1,03; рН — 6–7; лейкоциты — 0–5; билирубин, глюкоза, кровь, кетоны, белок — не обнаружены [7]. Выполнение физических нагрузок приводит к значительным сдвигам в химическом составе мочи и существенно влияет на её физико-химические свойства.

После выполненной физической нагрузки появилась тенденция к увеличению плотности мочи. рН незначительно снизилась. Обнаружены следы белка в постнагрузочный период. Вероятными причинами протеинурии являются повреждения почечных мембран, возникающие под действием мышечных нагрузок, а также появление в крови продуктов деградации тканевых белков. У спортсменов данное явление характерно для чрезмерных физических нагрузок, несоответствующих функциональному состоянию организма. Появление глюкозы в моче обусловлено повреждением почечных мембран, а также превышением почечного порога из-за высокого содержания глюкозы в крови. Все описанные изменения выявляются у спортсменов при интенсивных тренировках [1].

Выводы

1. Выполнен поиск и обоснование критериев, отображающих различные аспекты влияния экстремальных физических нагрузок на организм животных-биомоделей (мини-пигов). Выявлены схожие параметры между мини-пигами и людьми, перенёсшими тяжёлую (предельную) физическую нагрузку.

2. Обнаружено, что увеличение лейкоцитов за счёт нейтрофилов с одновременным уменьшением лимфоцитов характерно для человека, перенёсшего тяжёлую физическую нагрузку. Увеличение времени наблюдений до 24 ч позволило выявить наиболее значимые временные точки для дальнейших исследований. Ранее нами было показано, что предельная физическая нагрузка привела к статистически значимому повышению уровню лейкоцитов, изменению лейкоцитарной фракции за счёт увеличения количества нейтрофилов в постнагрузочный период (от 0 до 6 ч). Также впервые было показано, что истощающая физическая нагрузка вызывает кратковременное многократное повышение

транскрипции гена *HMGB1* в клетках лейкоцитарной фракции крови [4].

3. Повышение уровня лактата в крови мини-пигов происходит в таком же временном интервале (от 0 до 30 мин после нагрузки), что и у нетренированного человека.

4. По биохимическим преобразованиям в моче можно сделать вывод об уровне тренированности организма. Появление в моче патологических изменений в постнагрузоч-

ный период указывает на тяжёлую (экстремальную) физическую нагрузку.

5. Модель предельной физической нагрузки на мини-пигах может быть экстраполирована на человека. Исследованные критерии и впервые выявленные данные позволяют продолжить изучение влияния экстремальных физических нагрузок на организм животных-биомоделей и поиск способов адаптации и восстановления после перенесённого состояния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Барабанкина Е.Ю. Влияние гипоксических и гиперкапнических воздействий на восстановительные процессы у бегунов на средние дистанции. *Современные проблемы науки и образования*. 2013;1:27–39. [Barabankina E.Yu. Vliyaniye gipoksicheskikh i giperkapnicheskikh vozdeystviy na vosstanovitel'nye protsessy u begunov na srednie distantsii [The effect of hypoxic and hypercapnic effects on the recovery processes in middle-distance runners]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education]. 2013;1:27–39. (In Russian)].
2. Волков В.Н. Влияние физической нагрузки скоростно-силового характера на функциональное состояние нейтрофилов крови. *Вопросы физиологии*. 1989;2:3–5. [Volkov V.N. Vliyaniye fizicheskoy nagruzki skorostno-silovogo kharaktera na funktsional'noe sostoyaniye neytrofilov krovi [The effect of physical activity of a speed-strength nature on the functional state of blood neutrophils]. *Voprosy fiziologii* [Problems of physiology]. 1989;2:3–5. (In Russian)].
3. Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Ларюшина Н.А. Применение молекулярно-биологических методов оценки экспрессии цитокинов и сиртуинов в биомоделировании предельных физических нагрузок спортсменов. *Биомедицина*. 2021;17(3):10–16. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Laryushina N.A. Primeneniye molekulyarno-biologicheskikh metodov otsenki ekspressii tsitokinov i sirtuinov v biomodelirovaniy pre-del'nykh fizicheskikh nagruzok sportsmenov [The use of molecular biological methods for assessing the expression of cytokines and sirtuins in biomodeling extreme physical exertion of athletes]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2021;17(3):10–16. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-10-16.
4. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Петрова Н.В., Станкова Н.В., Алимкина О.В., Фокин Ю.В., Зубалий А.М., Ларюшина Н.А., Васильева И.А. Истошающая физическая нагрузка вызывает многократное повышение транскрипции гена *HMGB1* в лимфоцитах мини-пигов. *Биомедицина*. 2022;18(1):22–31. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V., Stankova N.V., Alimkina O.V., Fokin Yu.V., Zubaliy A.M., Laryushina N.A., Vasil'eva I.A. Istoshchayushchaya fizicheskaya nagruzka vyzyvaet mnogokratnoye povysheniye transkripsii gena *HMGB1* v limfotsitakh mini-pigov [Exhausting physical activity causes a multiple increase in the transcription of the *HMGB1* gene in the lymphocytes of mini-pigs]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2022;18(1):22–31. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-1-22-31.
5. Меерсон Ф.З. *Адаптация, стресс и профилактика*. М.: Наука, 2017:278. [Meerson F.Z. *Адаптация, стресс и профилактика* [Adaptation, stress and prevention]. Moscow: Nauka Publ., 2017:278. (In Russian)].
6. Павлов Б.А. К изучению двигательной активности нейтрофилов. *Лабораторное дело*. 1991;23:23–26. [Pavlov B.A. K izucheniyu dvigatel'noy aktivnosti neytrofilov [To the study of the motor activity of neutrophils]. *Laboratornoye delo* [Laboratory science]. 1991;23:23–26. (In Russian)].
7. Постников В.С., Комиссаров В.А. *Исследование мочи у животных*. М., 1989. [Postnikov V.S., Komissarov V.A. *Issledovanie mochi u zhivotnykh* [Urinalysis in animals]. Moscow, 1989. (In Russian)].
8. Станкова Н.В., Савина М.А. Непрямой субмаксимальный нагрузочный тест PWC170 определения физической работоспособности на светлогорских мини-свиньях. *Биомедицина*. 2021;17(3E):89–94. [Stankova N.V., Savina M.A. Nepryamoy submaksimal'nyy nagruzochnyy test PWC170 opredeleniya fizicheskoy rabotosposobnosti na svetlogorskikh mini-svin'yakh [Indirect submaximal load test PWC170 for determining physical performance on Svetlogorsk mini-pigs]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2021;17(3E):89–94. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-89-94.

9. Станкова Н.В., Савина М.А., Капанадзе Г.Д. Особенности адаптации светлогорских мини-свиней к физическим нагрузкам. *Биомедицина*. 2017;4:70–76. [Stankova N.V., Savina M.A., Kapnadze G.D. Osobennosti adaptatsii svetlogorskikh mini-sviney k fizicheskim nagruzkam [Features of adaptation of Svetlogorsk mini-pigs to physical exertion]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2017;4:70–76. (In Russian)].
10. Степанова О.И., Каркищенко В.Н., Клёсов Р.А., Станкова Н.В., Агельдинов Р.А., Савина М.А. Методика выделения лимфоидных клеток (мононуклеаров) из цельной крови, полученной от мини-свины. *Биомедицина*. 2020;16(3):54–59. [Stepanova O.I., Karkischenko V.N., Klesov R.A., Stankova N.V., Agel'dinov R.A., Savina M.A. Metodika vydeleniya limfoidnykh kletok (mononuklearov) iz tsel'noy krovi, poluchennoy ot mini-svin'i [A technique for isolating lymphoid cells (mononuclears) from whole blood obtained from a mini-pig]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2020;16(3):54–59. (In Russian)].
11. Шустов Е.Б., Фокин Ю.В., Капанадзе Г.Д., Берзин И.А., Станкова Н.В., Алимкина О.В., Матвеев Е.Л., Петрова Н.В. Сезонная динамика показателей физической работоспособности лабораторных животных. *Биомедицина*. 2016;1:66–73. [Shustov E.B., Fokin Yu.V., Kapnadze G.D., Berzin I.A., Stankova N.V., Alimkina O.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V. Sezonnaya dinamika pokazateley fizicheskoy rabotosposobnosti laboratornykh zhivotnykh [Seasonal dynamics of indicators of physical performance of laboratory animals]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:66–73. (In Russian)].
12. Grawitz E. Über Tyogene Leukozytose. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1910;29:1359–1362.
13. Winternitz N. Neue Untersuchungen über Blutveränderungen nach thermischen Eingriffen. *Med.* 1893:1017–1022.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Станкова Наталия Владимировна*, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: snv@scbmt.ru

Алимкина Оксана Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: alimkina@scbmt.ru

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;

e-mail: ipomytkin@mail.ru

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;

e-mail: scbmt@yandex.ru

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

e-mail: snv@scbmt.ru

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

e-mail: alimkina@scbmt.ru

Igor A. Pomytkin, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: ipomytkin@mail.ru

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

e-mail: scbmt@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ КОМПЛЕКСА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МУСКУСА КАБАРГИ СИБИРСКОЙ, В ЛИПОСОМИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

М.Т. Гасанов*, Ю.В. Фокин, С.Л. Люблинский, О.В. Алимкина, Л.А. Табоякова,
В.Н. Каркищенко

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

Субстанции, содержащие биологически активные вещества, получаемые из возобновляемых источников сырья растительного и животного происхождения, в липосомированной форме представляют значительный научно-практический интерес. Липосомированный препарат эффективнее всасывается в желудочно-кишечном тракте, сохраняя свою структуру, легко проникает внутрь клетки и практически не разрушается при первом прохождении через печень, что позволяет использовать меньшее количество действующего вещества при одной и той же биодоступности или увеличивать эффективную действующую концентрацию.

Установлено, что липосомы мускуса кабарги, вводимые в дозах, эквивалентных 300, 1500 и 3000 мг/чел./сут, обладают актопротекторным действием, его выраженность в минимальной дозе (300 мг) сопоставима с таковой максимальной дозы (3000 мг).

Курсовое ежедневное транспалатинальное введение липосом мускуса кабарги в течение 14-ти сут статистически достоверно повышает показатели физической выносливости и работоспособности крыс в тесте вынужденного плавания с грузом, кинезогидродинамической модели плавания и в тесте на ротараде. Повышение показателей сохраняется еще в течение 7-ми дней после прекращения введения, что свидетельствует о фармакологической кумуляции. Тестируемый препарат снижает локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность, не оказывает негативного влияния на психоэмоциональный и интоксикационный статус животных и местнораздражающего действия на пути введения, имеет 6-ю степень токсичности (относительно безвредные препараты).

Ключевые слова: мускус, кабарга, липосомы, доклинические исследования, мыши, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания «Клинические исследования лекарственного средства «Мускулив». Разработка технологии получения устойчивой формы наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, и его доклиническое исследование эффективности и безопасности» (шифр: «Технология-НЦБМТ»).

Для цитирования: Гасанов М.Т., Фокин Ю.В., Люблинский С.Л., Алимкина О.В., Табоякова Л.А., Каркищенко В.Н. Доклинические исследования эффективности и безопасности комплекса биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги сибирской, в липосомированной лекарственной форме. *Биомедицина*. 2022;18(4):48–62. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-48-62>

Поступила 29.09.2022

Принята после доработки 03.11.2022

Опубликована 01.12.2022

PRECLINICAL STUDIES OF THE EFFICIENCY AND SAFETY OF A COMPLEX OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ISOLATED FROM THE SECRETION OF SIBERIAN MUSK DEER IN A LIPOSOMAL DOSAGE FORM

Melik T. Gasanov*, Yuriy V. Fokin, Stanislav L. Lyublinskiy, Oksana V. Alimkina, Lidiya A. Taboyakova, Vladislav N. Karkischenko

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

Liposomal forms of preparations containing biologically active substances extracted from renewable sources of raw materials of plant and animal origin are attracting considerable research and practical interest. Liposomal drugs are efficiently absorbed in the gastrointestinal tract, retaining their structure while passing through the liver and entering the target cell. This allows either smaller amounts of the active substance to be used without losing bioavailability or its effective concentration to be increased.

Deer musk liposomes administered at doses equivalent to 300, 1500 and 3000 mg/person/day were found to exhibit an actoprotective effect, whose intensity at the minimum dose (300 mg) is comparable to that achieved at the maximum dose (3000 mg).

A course daily transpalatal administration of musk deer liposomes for 14 days was established to statistically significantly improve the indices of physical endurance and working capacity of rats in forced swimming tests under load, kineso-hydrodynamic models of swimming and rotarod performance tests. The observed increase in indicators persisted for another seven days after the cessation of administration, which indicates pharmacological cumulation. The tested drug reduces locomotor and orienting-exploratory activity, at the same time as exhibiting no adverse effect on the psycho-emotional and intoxication status of animals. In addition, no local irritant action on the route of administration was noted. The drug is assigned to toxicity class VI (relatively harmless).

Keywords: musk, musk deer, liposomes, preclinical studies, mice, rats

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

Funding: the work was carried out within the framework of the State task “Clinical studies of the drug “Muskuliv”. Development of a technology for obtaining a stable form of nanoparticles containing a complex of biologically active substances isolated from musk deer musk, and its preclinical study of efficacy and safety” (code: “Technology-SCBMT”).

For citation: Gasanov M.T., Fokin Yu.V., Lyublinskiy S.L., Alimkina O.V., Taboyakova L.A., Karkischenko V.N. Preclinical Studies of the Efficiency and Safety of a Complex of Biologically Active Substances Isolated from the Secretion of Siberian Musk Deer in a Liposomal Dosage Form. *Journal Biomed.* 2022;18(4):48–62. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-48-62>

Submitted 29.09.2022

Revised 03.11.2022

Published 01.12.2022

Введение

В настоящее время при создании новых лекарственных препаратов большое внимание уделяется не только синтезу действующего вещества, но и разработке системы доставки, которая должна обеспечивать быстроту наступления, а также предикативность характера, выраженности и продолжительности эффекта,

нивелировать эффект «первого прохождения через печень», а также создавать и поддерживать терапевтические концентрации действующего вещества в сыворотке крови.

Одной из таких стратегий является инкапсулирование (липосомирование) действующего вещества в водную фазу липосомы или её встраивание в липидный компонент.

В классическом понимании липосомы — это искусственно созданные везикулы, состоящие из одного или нескольких концентрических липидных бислоев, содержащих в себе одну или несколько водных камер. Выделяют моно- и многоламеллярные липосомы, мультивезикулярные липосомы, липосомы, покрытые полимерной оболочкой.

Липосомированный препарат эффективнее всасывается в желудочно-кишечном тракте, сохраняя свою структуру, и при этом практически не разрушается при первом прохождении через печень, что позволяет использовать меньшее количество действующего вещества при одной и той же биодоступности или увеличивать эффективную действующую концентрацию. При попадании к органу-мишени содержимое липосом легко проникает внутрь клетки благодаря биологической совместимости липосомной оболочки с клеточными структурами.

Особого внимания, с точки зрения перспективности предлагаемой лекарственной формы — липосомы, заслуживают субстанции, содержащие биологически активные вещества (БАВ), получаемые из возобновляемых источников сырья растительного и животного происхождения, представляющие научно-практический интерес.

Цель работы — изучить эффективность транспалатинального введения и безопасность (острая и субхроническая токсичности) липосомированной лекарственной формы комплекса биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги (липосом мускуса кабарги, ЛМК).

Материалы и методы

Дизайн и протокол эксперимента

Данная работа выполнена в ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» в соответствии с Федеральным законом от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; ГОСТ 53434-2009 от 02.12.2009 г.

«Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)»; Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др., 2012); Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях (под ред. Н.Н. Каркищенко и др., 2010) [9]; Приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Протокол исследования был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Животные и их содержание

Исследования по изучению эффективности и безопасности проводились на мышцах обоего пола линии BALB/c в возрасте около 2 мес. начальной средней массой 21,8±0,12 г и лабораторных белых крысах линии WAG/GY в возрасте около 2–2,5 мес. начальной средней массой 213,3±0,70 г. Определение показателей субхронической токсичности выполнялось на лабораторных белых крысах обоего пола линии WAG/GY в возрасте около 2–2,5 мес. начальной средней массой 211,6±0,58 г. Определение показателей эффективности выполнялось на белых лабораторных крысах Wistar в возрасте около 1,5–2 мес. начальной средней массой 180±20 г.

Лабораторные животные поступили из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл., Чеховский р-н) и распределялись по группам методом рандомизации. В качестве критериев приемлемости рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность групп по массе тела (±10%). Длительность карантина для всех животных составляла 14 дней. Животных содержали в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 г. 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» в вентилируемых клетках «Rair Iso System», группами по 5 осо-

бей. В качестве подстилки использовали стерильные древесные опилки из нехвойных пород деревьев. В качестве корма — стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 22–24 °С и относительная влажность 60–70%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения [5, 8].

Исследование эффективности ЛМК

Дозы, способы и длительность введения

В исследовании эффективности введение ЛМК осуществляли транспалатинально.

С учётом технологии получения липосом процент включения в них комплекса БАВ мускуса кабарги составил 50%, что определило начальную эффективную дозу тестируемого препарата, эквивалентную 300 мг/чел./сут. Для верификации эффективной дозы в скрининговом исследовании (тест вынужденного плавания с грузом) были дополнительно изучены ещё две дозы препарата: в 5 и 10 раз превосходящие начальную, т. е. 1500 и 3000 мг/чел./сут. С учётом метаболического коэффициента (для крыс — 5,9) в экспериментах использовали дозы 25, 125 и 250 мг/кг [4]. Курс введения составил 14 дней.

Период наблюдения и регистрируемые показатели

Нагрузочные тесты проводились до введения препарата (фоновые данные), а также на 7-е и 14-е сут через 1 ч ежедневно транспалатинального введения ЛМК. На 21-е сут тесты проводились для оценки следовых эффектов. Анализируемые пока-

затели — выносливость и работоспособность, поведение и психоэмоциональное состояние животных.

Методы оценки психофизиологического статуса животных

Тест вынужденного плавания с грузом

Представляет собой комбинированный жёсткий вид стресса, сочетающий физический и эмоциональный компоненты. Для проведения теста крысам к основанию хвоста прикрепляется груз, составляющий 10% от массы тела. Для оценки физической работоспособности без учёта специфического влияния температурного фактора используется вода термонеutralного для лабораторных животных диапазона 27±1 °С. Высота уровня воды в цилиндре составляет 75–90 см. Расстояние от кромки цилиндра до уровня воды — 20 см. Животное без резких движений погружается в воду, при начале плавательных движений включается секундомер. Критерий завершения теста плавания — погружение животного на дно бассейна без плавательных движений более чем на 10 сек, а также появление пузырьков вытесняемого из легких воздуха. В этот момент секундомер останавливается, а крыса быстро извлекается из воды и обсушивается сухим полотенцем. Анализируемый показатель, отражающий физическую работоспособность, — время предельного плавания.

Кинезогидродинамическая модель плавания

Основной принцип — создание гидроканала с изменяющимся встречным потоком жидкости, который должно преодолеть лабораторное животное. Гидроканал из прозрачного пластика прямоугольной и равнобокой трапециевидной формы в поперечном сечении (размеры 0,4×0,2×0,4 м, длина 120 см) оснащается с торцевых сторон водосборниками, обеспечивающими ламинарность потоков воды, циркуляционным насосом с регулируемой мощностью прокачки, теплообменниками для нагрева или охлаждения

ния прокачиваемой жидкости. Скорость квазиламинарного потока воды — 5 м/мин. Термокомфортная температура воды для данного исследования — 26 ± 2 °С. После периода обучения животное погружается в воду в стартовой зоне, доплывает до финишной зоны (домика-норки), с помощью секундомера регистрируется длительность заплыва, после чего снова возвращается на исходное положение, и тест повторяется до отказа, который является показателем утомления животного. Анализируемые показатели — длительность плавания, количество заплывов, расстояние.

Тест на ротороде

Животное помещается в закрытую камеру (30×30×40 см) с отверстиями для воздухообмена. Пол камеры состоит из стальных стержней, на которые подаётся постоянное напряжение 35–40 В (ток 1 А без учёта сопротивления кожи животных), что вынуждает животное запрыгивать на вращающийся вал (диаметр 7 см, поднят на высоту 15 см от пола) и в течение эксперимента передвигаться на нём со скоростью 1–1,5 об./сек. При начале передвижений животного по валу происходит включение секундомера. Критерием завершения теста служит определяемое визуально снижение выносливости и физическое утомление крысы, падающей на электрический пол камеры и не способной подняться на вал снова. В этот момент секундомер останавливается, а животное извлекается из камеры. Анализируемый показатель, отражающий физическую выносливость, — длительность передвижения животного на ротороде.

Оценка свободного поведения

Регистрация компонентов свободного поведения животных производится с применением автоматизированной системы «Laboras» (Metris B.V., Нидерланды), основанной на анализе вибрации, позволяющей определить тот или иной тип поведения

и позицию животного. Система установлена на платформу измерения, которая конвертирует движения животного в электрические сигналы. Увеличение и смещение предусилителя откорректированы с учётом массы животного. Блок управления одновременно обрабатывает сигналы от четырёх платформ измерения. Система позволяет вычислять длительность различных форм поведения: горизонтальная активность (локомоции), неподвижность (иммобилизация), вертикальная активность (стойки), умывание (груминг) и прочие элементы системного поведения, включающие стереотипные движения и иные сложные формы поведенческой активности животных. Продолжительность эпохи анализа — 15 мин.

Анализ психоэмоционального состояния

Ультразвуковая вокализация (УЗВ) — издаваемые лабораторными животными высокочастотные колебания в ультразвуковом диапазоне, не слышимые человеком, свидетельствующие об эмоциональных и мотивационных изменениях животных и являющиеся их коммуникативной функцией. УЗВ регистрируется с помощью автоматизированной системы «Sonotrack» (Metris B.V., Нидерланды). Специальные микрофоны и оборудование устанавливаются дистанционно, на расстоянии 20–25 см от головы животных, и позволяют регистрировать сигнал частотой от 15 до 100 кГц и записывать его в цифровом формате для дальнейшей обработки. Частота дискретизации составляет 200 кГц. После удаления физических артефактов (монотонных шумов) осуществляется спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье с помощью пакета программ MATLAB-5.5 методом Уэлча (функция `pwelch`). Эпоха анализа составляет 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье (Nfft) — 2000 интервалов. Значения спектральной

плотности мощности (СПМ) рассчитываются как отношение СПМ животного к фону окружающей среды (в процентах). После вычислений СПМ находятся медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного. Продолжительность эпохи анализа — 15 мин.

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов эксперимента осуществлялась с использованием компьютерной программы «Statistica 10» (StatSoft Inc., США) с учётом t-критерия Стьюдента для парных выборок, для оценки статистической значимости изменений внутри группы при анализе УЗВ используется непараметрической критерий ANOVA.

Исследование безопасности ЛМК

Дозы, способы и длительность введения

В исследовании острой токсичности введение раствора липосом, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, осуществляли в пяти возрастающих дозах по Литчфилду—Уилкоксона (500–2500–5000–7500–15000 мг/кг) внутрижелудочно зондово однократно [2]. Для исследования каждой дозы препарата использовались группы по 20 животных разного пола (10 самцов и 10 самок).

В исследовании субхронической токсичности введение препарата осуществляли транспалатинально (втирированием в нёбо) с помощью металлического медицинского шпателя в дозах 25 и 250 мг/кг 1 раз в сутки в течение 30 дней. В соответствии с методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических средств субхроническую токсичность вещества при его системном применении исследуют в нескольких дозах [3, 7]. Минимальная доза при изучении субхронической токсичности должна быть близка к терапевтической дозе [1, 6, 10]. На основании этого и с учётом

межвидового коэффициента пересчёта доз для крыс в качестве минимальной для изучения субхронической токсичности на крысах была выбрана доза 25 мг/кг в сутки (максимальная суточная доза для человека с учётом коэффициента пересчёта доз для крыс — 5,9). В качестве второй дозы выбрали дозу в 250 мг/кг в сутки, что в 10 раз превышает максимальную дозу для человека. Для исследования каждой дозы препарата использовались группы по 30 животных разного пола (15 самцов и 15 самок).

Животным контрольной группы вводили физ. р-р (0,9%-ный натрия хлорид) в объёме, соответствующем объёму препарата при максимальной дозе.

Период наблюдения и регистрируемые показатели

В исследовании острой токсичности период наблюдения составлял 14 сут. Регистрируемые показатели: летальность, время гибели животных, симптоматика отравления, ежедневное наблюдение общего состояния и поведения, взвешивание, вскрытие и макроскопическое описание погибавших и всех выживших животных в конце исследования (эвтаназия осуществлялась передозировкой эфира), определение массовых коэффициентов внутренних органов.

В исследовании субхронической токсичности период наблюдения составлял 30 сут. Общее состояние оценивалось при ежедневном осмотре животных. Взвешивание, измерение ректальной температуры, потребление воды и корма выполнялось один раз в неделю и после окончания эксперимента. Физиологические исследования проводились до начала, во время и в конце исследований. Гематологические и биохимические исследования проводились через 30 дней после начала исследования. Макроскопическое и гистологическое исследование внутренних органов проводились постмортально.

Методы оценки интоксикационного статуса животных

В исследовании безопасности тестируемого препарата оценивались клинико-токсикологические параметры (особенности поведения, состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, количество и консистенция фекальных масс, частота мочеиспускания и др.), масса тела и внутренних органов, проводились макроскопические исследования (острая токсичность); в режиме субхронической токсичности дополнительно анализировались потребление корма и воды, ректальная температура, функция сердечно-сосудистой системы (систолическое артериальное давление и частота сердечных сокращений с помощью аппаратно-программного комплекса «Систола» (ООО «Нейроботикс», Россия) через 1 ч после введения препарата), функция нервной системы и поведение (с помощью системы «Laboras» (Metris B.V., Нидерланды) за период 30 мин), функция выделительной системы (рН мочи, плотность, качественное определение белка в моче на анализаторе мочи «URISIS 1100»), гематологические и биохимические параметры (биохимические показатели крови — АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза, общий белок, альбумин, холестерин, триглицериды — определяли на биохимическом анализаторе «ChemWell+» (США) с использованием реагентов фирмы «Spinreact» (Испания) в сыворотке крови из подключичной вены без следов гемолиза; гематологические исследования цельной крови выполнялись на гематологическом анализаторе «BC-3600» (Mindray); состояние свёртывающей системы крови оценивали на приборе «Thrombostat»); патоморфологические и гистологические параметры (забой выживших животных на 30-й день с помощью передозировки диэтиловым эфиром, ткани внутренних органов фиксировались в 10%-ном р-ре нейтрального формали-

на, после обезвоживания и заливки в парафин готовились гистологические срезы при помощи микротомы с последующим окрашиванием гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону, срезы головного мозга окрашивали по Ниссля, исследования проводились с помощью цифровой микроскопии (микроскоп CX41 фирмы «Olimpus», Япония)), изучение местно-раздражающего действия (по состоянию слизистой оболочки полости рта после 30-дневного транспалатинального введения).

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов эксперимента осуществлялась с использованием компьютерной программы «Statistica 10» (StatSoft Inc., США) с учётом t-критерия Стьюдента для парных выборок. Анализ данных для самцов и для самок проводился независимо, что позволяло не лимитировать себя априорно определённой моделью взаимодействия гендерного фактора с остальными.

Результаты и их обсуждение

Исследование эффективности ЛМК

Тест вынужденного плавания с грузом

Анализ результатов исследования (табл. 1) показал, что на фоне применения ЛМК в трёх тестируемых дозах отмечается повышение выносливости животных на всех этапах эксперимента. Максимальные показатели отмечаются на 14-й день курсового введения, достигая примерно одинаковых значений для доз 300 и 3000 мг — 29,8 и 30,5% соответственно. В два раза слабее действовала доза 1500 мг. Через 7 дней после прекращения её введения, по отношению к фоновым данным и сопоставимому результату контрольной группы, эффект отсутствовал. Наибольшие приросты отмечаются при дозе, эквивалентной 300 мг/чел., которая повышает работоспособность на 30% и сохраняет её на высоком уровне ещё в течение недели после окончания введе-

Таблица 1. Влияние курсового транспалатального введения липосом мускуса кабарги на время плавания животных, сек (среднее по группе)

Table 1. Effect of course transpalatal administration of musk deer liposomes on the swimming time of animals, sec (group average)

| Период эксперимента / Доза (на чел.) | Фон | 7-е сут | 14-е сут | 21-е сут |
|--------------------------------------|----------|-----------|------------|------------|
| Контроль | 89,8±4,2 | 92,2±5,1 | 93,8±2,6 | 93,2±6,8 |
| 300 мг | 84,5±5,2 | 97,5±4,3* | 110,3±3,3* | 101,8±3,9* |
| 1500 мг | 86,5±2,7 | 95,8±2,2* | 99,5±2,3* | 89,7±3,7 |
| 3000 мг | 83,8±5,8 | 95,8±2,2* | 108,7±3,3* | 104,2±2,2* |

Примечание: * — достоверно по сравнению с фоновыми значениями при $p \leq 0,05$.

Note: * — statistically significant compared to the background values at $p < 0.05$.

Таблица 2. Влияние курсового транспалатального введения липосом мускуса кабарги на показатели работоспособности в кинезогидродинамической модели плавания

Table 2. Effect of course transpalatal administration of musk deer liposomes on performance indicators in a kinesi-hydrodynamic model of swimming

| Период эксперимента | Группа / Показатель | Контроль | Липосомы мускуса |
|---------------------|---|----------|------------------|
| Фоновые данные | Среднее время плавания, сек | 9,3±1,4 | 10,1±1,2 |
| | Среднее количество заплывов | 3,7±0,8 | 3,8±1,0 |
| | Общее расстояние (работоспособность), м | 22,4 | 24,6 |
| 7-е сут | Среднее время плавания, сек | 9,2±2,1 | 15,8±2,0* |
| | Среднее количество заплывов | 4,3±0,8 | 5,2±0,8 |
| | Общее расстояние (работоспособность), м | 26,3 | 45,1 |
| 14-е сут | Среднее время плавания, сек | 10,7±2,2 | 18,9±2,1* |
| | Среднее количество заплывов | 4,3±0,5 | 6,5±1,0* |
| | Общее расстояние (работоспособность), м | 28,9 | 64,8 |
| 21-е сут | Среднее время плавания, сек | 11,2±2,2 | 16,1±2,1* |
| | Среднее количество заплывов | 3,8±0,8 | 5,8±0,8* |
| | Общее расстояние (работоспособность), м | 26,4 | 51,6 |

Примечание: * — достоверно по сравнению с фоновыми значениями при $p \leq 0,05$.

Note: * — statistically significant compared to the background values at $p < 0.05$.

ния, в связи с чем принята в качестве оптимальной для дальнейших исследований.

Кинезогидродинамическая модель плавания

Анализ результатов исследования (табл. 2) обнаружил, что через 7 сут после начала введения ЛМК показатели выносливости и работоспособности возрастали в 1,2 и 1,7 раза соответственно, по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе, и на 34,8 и 83,3% — по отношению к фоновым значениям. На 14-е сут эксперимента повышение данных показателей продолжилось, составив 1,5 и 2,2 раза по отношению к контрольной группе животных, и, соответственно, 69,6 и 163,4% —

по сравнению с фоновыми показателями. Через 7 сут после прекращения введения ЛМК (21-е сут эксперимента) значения выносливости и работоспособности экспериментальной группы животных превосходили аналогичные контрольной группы в 1,5 и 2,0 раза, а по сравнению с фоновыми значениями — были выше на 52,6 и 109,8% соответственно.

Тест на ротороде

Анализ результатов исследования (табл. 3) показал, что введение ЛМК на 7-е сут увеличивает выносливость крыс в 2,6 раза, на 14-е сут эксперимента данный показатель увеличивается еще на 31,5%, а через неделю после прекраще-

ния введения, несмотря на снижение показателя на 32,3% по сравнению с 14-ми сут эксперимента, он превышал фоновые значения в 2,6 раза. Таким образом, обнаружено статистически достоверное повышение выносливости в тесте на ротароде через 7 сут ежедневного введения (156,5% по сравнению с фоновыми значениями), стабильное повышение показателя к 14-м сут, сохранение актопротекторного эффекта в течение 7 дней после прекращения введения.

Оценка свободного поведения

Анализ результатов исследования (табл. 4) показал, что в период эксперимента в динамике поведенческих форм контрольной группы животных отмечается повышение двигательной активности и ЭСП на фоне снижения длительности неподвиж-

ности и умывания. В динамике поведенческих форм опытной группы отмечаются противоположные эффекты: снижение двигательной активности и ЭСП на фоне повышения длительности неподвижности и умывания. Таким образом, введение ЛМК вызывает замедление локомоторной и ориентировочной-исследовательской деятельности и торможение центральной нервной системы в целом.

Анализ психоэмоционального состояния

Результаты исследований отражены на рис. 1–4.

Максимум СПМ УЗВ животных обеих групп в фоновых измерениях (рис. 1) обнаруживается в диапазоне 37–43 кГц, что свидетельствует о благоприятном (позитивном) психоэмоциональном состоянии животных.

Таблица 3. Влияние курсового транспалатального введения липосом мускуса кабарги на выносливость крыс в тесте на ротароде

Table 3. Effect of course transpalatal administration of musk deer liposomes on the endurance of rats in a rotarod test

| Период эксперимента / Группа | Фон | 7-е сут | 14-е сут | 21-е сут |
|---------------------------------|----------|------------|------------|------------|
| Контроль | 47,8±3,6 | 50,5±3,2 | 48,7±2,7 | 51,2±2,2 |
| Липосомы мускуса | 49,2±3,2 | 126,2±4,2* | 141,7±2,7* | 125,8±3,2* |

Примечание: * — достоверно по сравнению с фоновыми значениями при $p \leq 0,05$.

Note: * — statistically significant compared to the background values $p < 0,05$.

Таблица 4. Влияние курсового транспалатального введения липосом мускуса кабарги на свободное поведение крыс

Table 4. Effect of course transpalatal administration of musk deer liposomes on the free behavior of rats

| Период исследования | ЭСП | Длительность формы поведения (сек) | | | |
|---------------------|-----|------------------------------------|-----|------|-----|
| | | Г.а. | Им. | В.а. | Гр. |
| <i>Контроль</i> | | | | | |
| фон | 88 | 9 | 382 | 58 | 363 |
| 7-й день | 284 | 38 | 231 | 164 | 183 |
| 14-й день | 267 | 31 | 285 | 114 | 203 |
| 21-й день | 238 | 45 | 214 | 160 | 243 |
| <i>Опыт</i> | | | | | |
| фон | 374 | 67 | 26 | 272 | 161 |
| 7-й день | 339 | 21 | 215 | 139 | 186 |
| 14-й день | 265 | 26 | 253 | 135 | 221 |
| 21-й день | 244 | 26 | 222 | 116 | 292 |

Примечание: ЭСП — элементы системного поведения, Г.а. — горизонтальная активность (локомоции), Им. — иммобилизация (неподвижность), В.а. — вертикальная активность (стойки), Гр. — груминг (умывание).

Note: ЭСП — elements of systemic behavior; Г.а. — horizontal activity (locomotion), Им. — immobility, В.а. — vertical activity (racks), Гр. — grooming (washing).

Картины УЗВ обеих экспериментальных групп (рис. 2) в этот период эксперимента также сходны, но несколько неоднозначны: отсутствуют явные максимумы спектральной мощности в каком-либо из информативных диапазонов, что может указывать на пограничное (переходное) эмоциональное состояние животных.

Максимум СПМ УЗВ (рис. 3) крыс контрольной группы на данном этапе исследования обнаруживается в диапазоне около 37–42 кГц. Дополнительные низкоамплитудные пики прослеживаются на частоте около 20 кГц, однако их спектральная мощность более чем на 20% ниже преобладающего диапазона, что свидетельствует о преимущественно комфортном психоэмоциональном состоянии животных.

Максимальная мощность УЗВ крыс опытной группы регистрируется в широком частотном диапазоне: около 40 и 23 кГц с разницей в спектральной мощности менее 20%, что отражает переходное (пограничное) состояние животных.

Оба графика УЗВ (рис. 4) не имеют выраженных экстремумов, интерпретация эмоционального статуса неоднозначна, состояние животных можно характеризовать как пограничное (смешанное).

Таким образом, изучение ультразвуковой вокализации контрольной и опытной групп животных выявило схожесть большинства анализируемых параметров в динамике эксперимента, что позволяет в целом судить о незначительном влиянии (в т. ч. отсутствии негативных эффектов) тестируемого препарата на психоэмоциональное состояние крыс.

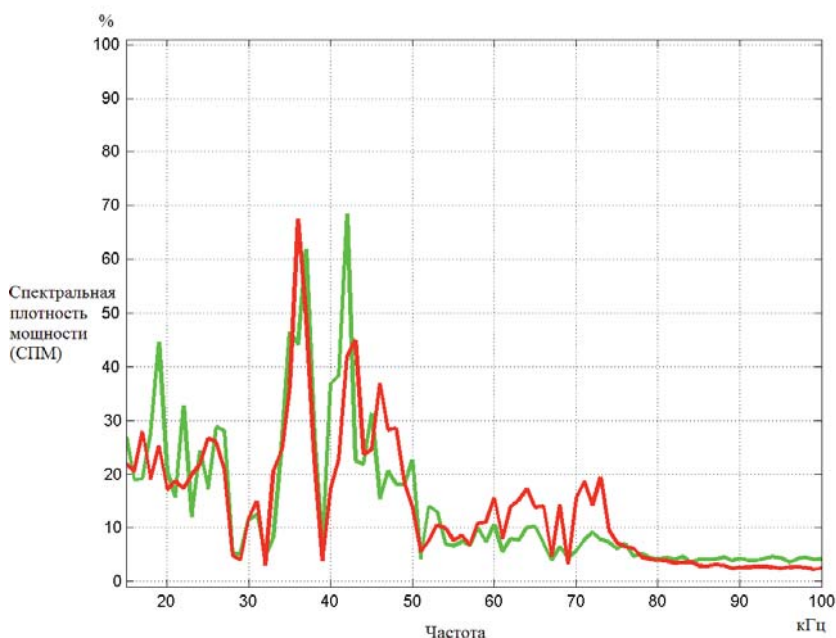


Рис. 1. УЗВ крыс в фоновых измерениях. По оси абсцисс — частота УЗВ, кГц. По оси ординат — спектральная плотность мощности (СПМ) УЗВ, %. Зелёная кривая — контрольная группа, красная кривая — опытная группа.
Fig. 1. Ultrasonic vocalization (USV) in rats in background measurements. The abscissa shows the USV frequency, kHz. The y-axis shows the power spectral density (PSD) of USV, %. The green curve is the control group, the red curve is the experimental group.

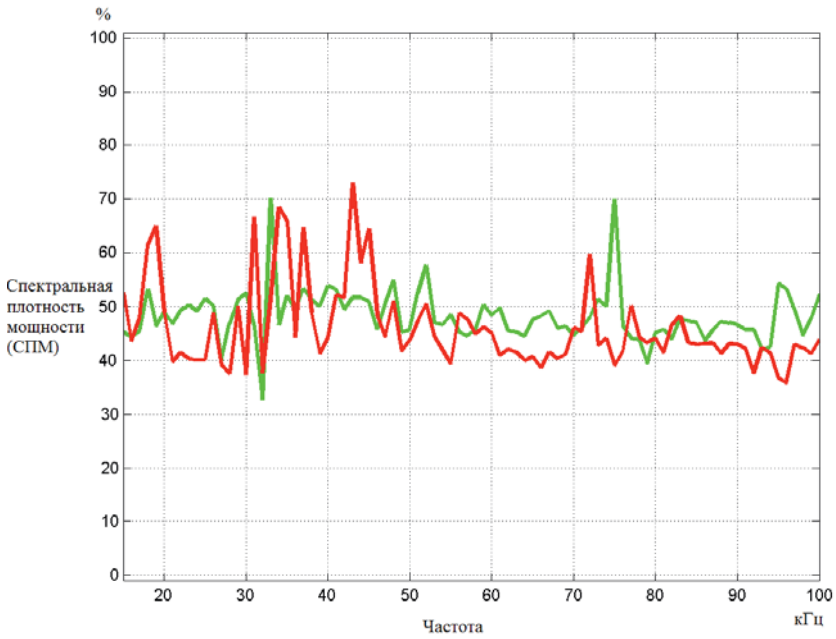


Рис. 2. УЗВ крыс в 7-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 1.
Fig. 2. USV of rats on the 7th day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 1.

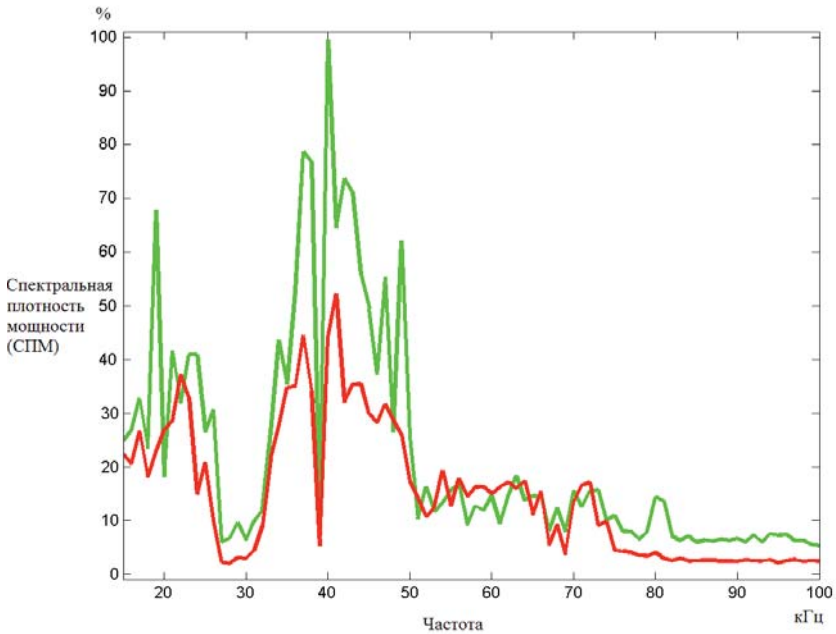


Рис. 3. УЗВ крыс в 14-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 1.
Fig. 3. USV of rats on the 14th day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 1.

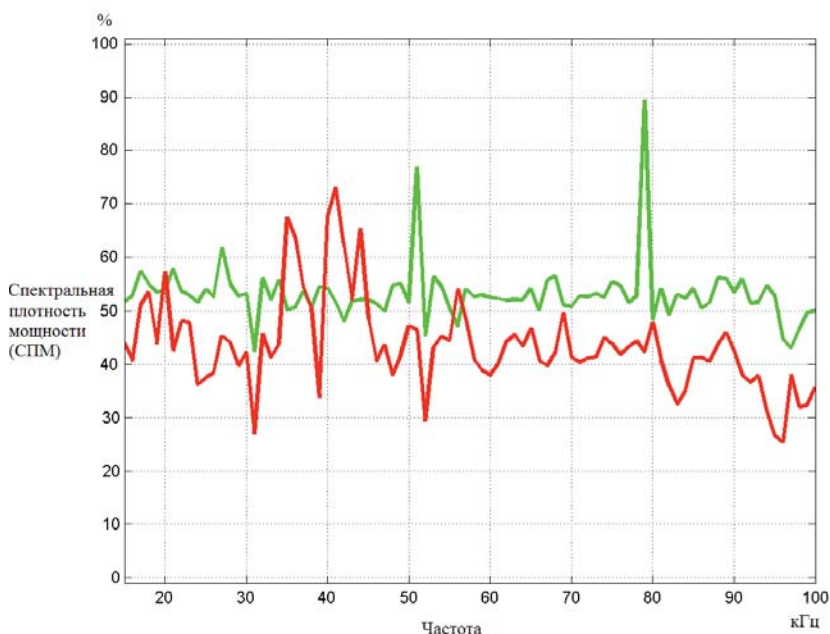


Рис. 4. УЗВ крыс в 21-й день эксперимента. Все обозначения — как на рис. 1.
Fig. 4. USV of rats on the 21th day of the experiment. All designations are similar to those in Fig. 1.

Исследование безопасности ЛМК

На основе токсиметрического исследования не выявлено летальных эффектов и, соответственно, не определены уровни летальных доз для мышей и крыс. Все животные удовлетворительно перенесли интоксикацию, и по окончании действия препарата признаков отсроченного влияния (продолжительной клинической интоксикации) не выявлено.

При исследовании острой токсичности на грызунах при внутрижелудочном пути введения тестируемого препарата выявить значения LD_{50} не представляется возможным. Максимальная доза исследуемого вещества по объёму введения для животных обоего пола составила 15000 мг/кг. Вскрытие животных спустя 14 дней после однократного введения препарата не показало наличия каких-либо остаточных явлений, связанных с перенесённой интоксикацией. Таким образом, полученные результаты по-

зволяют предположить, что исследуемый препарат на основе ЛМК имеет 6-ю степень токсичности (относительно безвредные препараты).

Проведёнными исследованиями по изучению субхронической токсичности при транспалатальном способе введения ЛМК аутбредным крысам в дозах 25 и 250 мг/кг установлено, что введение тестируемого препарата подопытные животные перенесли одинаково хорошо, на протяжении всего исследования смертности выявлено не было. Из клинических признаков на протяжении всего исследования было отмечено незначительное снижение двигательной активности и мышечного тонуса у животных, получавших препарат в обеих дозах, по сравнению с контролем. Достоверных отличий в поведенческих реакциях между подопытными группами не было. Анализ данных по взвешиванию подопытных животных не выявил измене-

ний интенсивности прироста массы тела, тестируемый препарат не оказывает влияния на потребление корма и воды, температуру тела. Убедительного влияния исследуемого препарата на сердечно-сосудистую, нервную и выделительную систему, а также на гематологические и биохимические показатели не обнаружено. Патанатомическое исследование изменений в морфологическом и гистологическом строении внутренних органов и систем не выявило. Транспалатинальное введение препарата крысам не вызывало раздражения, воспаления или деструкции органов и тканей пищеварительной системы (слизистая оболочка ротовой полости розоватого цвета, блестящая, влажная, без гиперемии, эрозий, кровоизлияний), свидетельствующих о местно-раздражающем действии. Таким образом, полученные результаты исследования субхронической токсичности свидетельствуют об отсутствии негативного влияния препарата на интоксикационный статус животных.

Выводы

1. Липосомы мускуса, вводимые в дозах, эквивалентных 300, 1500 и 3000 мг/чел./сут, обладают актопротекторным действием, при этом его выраженность в дозе 300 мг сопоставима с таковой дозы 3000 мг, в связи с чем минимальная доза принята в качестве оптимальной для исследований эффективности.

2. Курсовое ежедневное транспалатинальное введение липосом мускуса кабарги в течение 14-ти сут статистически

достоверно повышает показатели физической выносливости и работоспособности крыс: в тесте вынужденного плавания с грузом отмечается прирост показателей на 27%, в кинезогидродинамической модели плавания — на 32%, в тесте на ротароде — на 186% по сравнению с фоновыми данными и сопоставимыми значениями контрольной группы. Повышение показателей сохраняется еще в течение 7-ми дней после прекращения введения препарата и составляет до 150%.

3. Курсовое ежедневное транспалатинальное введение липосом мускуса кабарги в течение 14-ти сут вызывает снижение локомоторной и ориентировочной-исследовательской активности (торможение ЦНС) и не оказывает убедительного, в т. ч. негативного, влияния на психоэмоциональный статус крыс.

4. Липосомы мускуса кабарги при курсовом транспалатинальном введении обладают способностью к фармакологической кумуляции.

5. Липосомированная лекарственная форма комплекса биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, имеет 6-ю степень токсичности (относительно безвредные препараты), значений LD_{50} при определении острой токсичности не обнаружено.

6. Исследования субхронической токсичности липосом мускуса кабарги свидетельствуют об отсутствии их отрицательного влияния на интоксикационный статус животных и местнораздражающего действия на пути введения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Белоусов Ю.Б., Зырянов С.К. Проблема эквивалентности оригинальных и воспроизведенных лекарственных средств с позиции клинического фармаколога. *Ведомости Научного центра экспертизы: средства медицинского применения*. 2007;1:12–17. [Belousov Yu.B., Zyryanov S.K. Problema ekvivalentnosti original'nyh i vosproizvedennyh lekarstvennyh sredstv s pozicii klinicheskogo

farmakologa [The problem of equivalence of original and generic drugs from the point of view of a clinical pharmacologist]. *Vedomosti Nauchnogo centra ekspertizu: sredstva medicinskogo primeneniya* [Bulletin of the Scientific Center for Expertise: medical products]. 2007;1:12–17. (In Russian)].

2. Березовская И.В. Прогноз безопасности лекарственных средств в доклинических токсикологи-

- ческих исследованиях. *Токсикологический вестник*. 2010;5:17–22. [Berezovskaya I.V. Prognoz bezopasnosti lekarstvennykh sredstv v doklinicheskikh toksikologicheskikh issledovaniyakh [Prediction of drug safety in preclinical toxicological studies]. *Toksikologicheskiiy vestnik [Toxicological Bulletin]*. 2010;5:17–22. (In Russian)].
3. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. *Общие механизмы токсического действия*. Л.: Медицина, 1986:280. [Golikov S.N., Sanotsky I.V., Tiunov L.A. *Obshchie mekhanizmy toksicheskogo dejstviya [General mechanisms of toxic action]*. Leningrad: Medicina Publ., 1986:280. (In Russian)].
4. Гуськова Т.А. *Токсикология лекарственных средств*. М.: Русский врач, 2003:154. [Guskova T.A. *Toksikologiya lekarstvennykh sredstv [Toxicology of drugs]*. Moscow: Russkij vrach Publ., 2003:154. (In Russian)].
5. Каркищенко Н.Н. *Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии*. М.: Изд-во ВПК, 2007:448. [Karkischenko N.N. *Al'ternativy biomeditsiny. T. 2. Klassika i al'ternativy farmakotoksikologii [Alternatives to biomedicine. Vol. 2. Classics and alternatives of pharmacotoxicology]*. Moscow: VPK Publ., 2007:448. (In Russian)].
6. *Клиническая фармакология*. Под ред. акад. РАМН, проф. В.Г. Кукеса. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006:938. [*Klinicheskaya farmakologiya [Clinical pharmacology]*. Ed. by Acad. RAMS, Prof. V.G. Kukes. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2006:938. (In Russian)].
7. Красовский Г.Н., Рахманин Ю.А., Егорова Н.А. *Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека*. М.: Медицина, 2009:208. [Krasovskiy G.N., Rakhmanin Yu.A., Egorova N.A. *Ekstrapolyaciya toksikologicheskikh dannykh s zhivotnykh na cheloveka [Extrapolation of toxicological data from animals to humans]*. Moscow: Medicina Publ., 2009:208. (In Russian)].
8. Кукес В.Г. Клинико-фармакологические подходы к повышению качества доклинических и клинических исследований новых лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2006;1:7–10. [Kukes V.G. *Kliniko-farmakologicheskie podhody k povysheniyu kachestva doklinicheskikh i klinicheskikh issledovaniy novykh lekarstvennykh sredstv [Clinical and pharmacological approaches to improving the quality of preclinical and clinical studies of new drugs]*. *Vedomosti Nauchnogo centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya [Bulletin of the Scientific Center for Expertise of Medicinal Products]*. 2006;1:7–10. (In Russian)].
9. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Под ред. Н.Н. Каркищенко и др. М.: Профиль-2С, 2010:358. [*Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh [Manual on laboratory animals and alternative models in biomedical research]*. Ed. by N.N. Karkischenko, et al. Moscow: Profil'-2S Publ., 2010:358. (In Russian)].
10. Frank A. *Barile Clinical Toxicology. Principles, and Mechanisms*. London, New York, Washington: CRC Press, 2004:441.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Гасанов Мелик Тофикович*, к.м.н., доц., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

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

Люблинский Станислав Львович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: mobitek-m@mail.ru

Melik T. Gasanov*, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m.gasanov@scbmt.ru

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

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

Алимкина Оксана Владимировна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: alimkina@scbmt.ru

Табоякова Лидия Александровна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: lida-vet@mail.ru

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

e-mail: scbmt@yandex.ru

Oksana V. Alimkina, Scientific Center of Bio-
medical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;

e-mail: alimkina@scbmt.ru

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center of Bio-
medical Technologies of the Federal Medical and
Biological Agency of Russia;

e-mail: lida-vet@mail.ru

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

e-mail: scbmt@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

БЛОКАДА КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ КАРДИОМИОЦИТОВ КРОЛИКА ВОССТАНАВЛИВАЕТ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В МОДЕЛИ ВИБРАЦИОННО-ОПОСРЕДОВАННОЙ ГИПОКСИИ

В.В. Воробьева^{1,3,*}, О.С. Левченкова², П.Д. Шабанов^{1,3}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

² ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России
214019, Российская Федерация, Смоленск, ул. Крупской, 28

³ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России
194044, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Лебедева, 6

Оценено действие блокатора кальциевых каналов (БКК) нифедипина в дозе 7,5 мг/кг на энергетический обмен кардиомиоцитов кролика в условиях вибрационно-опосредованной (56 сеансов вибрации 44 Гц, амплитудой 0,5 мм) модели клеточной гипоксии. Энергетический обмен нативных митохондрий сердца в 30%-ном гомогенате ткани изучали полярографическим методом, регистрируя скорости поглощения кислорода митохондриями при 37 °С в 1 мл солевой среды инкубации, уравновешенной с кислородом воздуха. У животных, подвергнутых вибрации на фоне БКК, скорость эндогенного дыхания (V_o) оставалась на уровне интактных животных, амиталчувствительность повышалась на 39% ($p < 0,05$), малонатчувствительность уменьшалась на 40% ($p < 0,05$). Малаксоксидазная активность в состоянии «покоя» увеличивалась, а гиперактивация системы окисления эндогенной янтарной кислоты снижалась по сравнению с показателями животных, подвергнутых вибрации без фармакологической защиты, свидетельствуя о кардиопротективном действии нифедипина, предотвратившем развитие некроза кардиомиоцитов.

Ключевые слова: вибрация, энергетический обмен кардиомиоцита, митохондрии, нифедипин, тканевая гипоксия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Воробьева В.В., Левченкова О.С., Шабанов О.С. Блокада кальциевых каналов кардиомиоцитов кролика восстанавливает активность фермент-субстратных комплексов дыхательной цепи в модели вибрационно-опосредованной гипоксии. *Биомедицина*. 2022;18(4):63–73. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-63-73>

Поступила 18.04.2022

Принята после доработки 14.07.2022

Опубликована 10.12.2022

BLOCKADE OF RABBIT CARDIOMYOCYTE CALCIUM CHANNELS RESTORES THE ACTIVITY OF ENZYME-SUBSTRATE COMPLEXES OF THE RESPIRATORY CHAIN IN A MODEL OF VIBRATION-MEDIATED HYPOXIA

Viktoriya V. Vorobieva^{1,3*}, Olga S. Levchenkova², Petr D. Shabanov^{1,3}

¹ *Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, Saint-Petersburg, Akademika Pavlova Str., 12*

² *Smolensk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
214019, Russian Federation, Smolensk, Krupskoy Str., 28*

³ *Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia
194044, Russian Federation, St. Petersburg, Lebedeva Str., 6*

The effect of nifedipine, a calcium channel blocker (CCB), at a dose of 7.5 mg/kg on the energy metabolism of rabbit cardiomyocytes was evaluated in a vibration-mediated model of cellular hypoxia (56 sessions of vibration 44 Hz, amplitude 0.5 mm). The energy metabolism of native heart mitochondria in a 30% tissue homogenate was assessed using a polarographic method, by recording the rate of oxygen uptake by mitochondria at 37°C in 1 ml of a saline incubation medium, equilibrated with atmospheric oxygen. In the animals exposed to vibration against the background of CCB, the rate of endogenous respiration (V_o) remained at the level of intact animals, with the amylal sensitivity increasing by 39% ($p < 0.05$) and the malonate sensitivity decreasing by 40% ($p < 0.05$). The malate oxidase activity at rest increased, and hyperactivation of the endogenous succinic acid oxidation system decreased as compared to the indices of the animals exposed to vibration without pharmacological protection. The observed results indicate the cardioprotective effect of nifedipine, which prevented the development of cardiomyocyte necrosis.

Keywords: vibration, energy metabolism of cardiomyocytes, mitochondria, nifedipine, tissue hypoxia

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

For citation: Vorobieva V.V., Levchenkova O.S., Shabanov P.D. Blockade of Rabbit Cardiomyocyte Calcium Channels Restores the Activity Of Enzyme-Substrate Complexes of the Respiratory Chain in a Model of Vibration-Mediated Hypoxia. *Journal Biomed.* 2022;18(4):63–73. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-63-73>

Submitted 18.04.2022

Revised 14.07.2022

Published 10.12.2022

Введение

Воздействие вибрации способствует развитию не только профессиональной патологии с нарушением кровоснабжения конечностей, но и заболеваниям, имеющим сложную многофакторную этиологию, таким как ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, болезни опорно-двигательного аппарата, желудочно-кишечного тракта и почек [7]. Немаловажное значение в патогенезе вибрационно-опосредованной сочетанной патологии имеет изменение кальциевого гомеостаза вследст-

вие нарушения уровней глюкокортикоидов [5], соматотропина, кальцийрегулирующих гормонов и витамина D, снижение кальций-связывающей способности сыворотки крови, уменьшение почечного клиренса кальция, повышение содержания в сыворотке крови общего и, особенно, ионизированного кальция [8].

Т. к. кальций в организме выполняет многообразные посреднические и регулирующие физиологические функции, то нарушение метаболизма кальция — важный элемент патогенеза различных сердечно-

сосудистых заболеваний у больных с вибрационной болезнью [7, 14]. В результате патологических изменений гемодинамики у больных с вибрационной болезнью развивается гипоксия тканей, повышается кислородная стоимость единицы работы миокарда, удлиняется время ликвидации кислородного долга на фоне высокой потребности в кислороде в покое и при физической нагрузке, снижается толерантность к физической нагрузке.

В регуляции внутриклеточного кальциевого гомеостаза важнейшую роль играют митохондрии, имеющие ряд идентифицированных к настоящему времени специфических, транспортирующих ионы кальция, структур, в частности митохондриальный Ca^{2+} -унипортер, белковый состав которого зависит от типа ткани [18]. Макромолекулярная структура митохондриального Ca^{2+} -унипортера функционирует параллельно с эндоплазматическим ретикуломом благодаря наличию МАМ контактов (мембраны, ассоциированные с митохондриями) [19], в которых ионы кальция, высвобождаемые из эндоплазматического ретикула, могут быть поглощены митохондриями. За освобождение ионов кальция из ретикула в зону МАМ контакта отвечают IP_3 рецепторы (IP_3R — рецептор инозитол 1,4,5-трифосфата), после контакта с которыми Ca^{2+} свободно движется в митохондрии через VDAC-каналы (порин) внешней митохондриальной мембраны благодаря функционированию белка-шаперона GRP75 (glucose-regulated protein 75), митофузина 2 (MFN2) и 8 белков, содержащих домен PDZ (PDZ domain-containing protein 8). Все названные структуры функционально сопряжены и работают в зависимости от их окислительно-восстановительного потенциала [17].

Непрерывное взаимодействие энергозависимых процессов торможения и усиления транспорта ионов через клеточную мембрану в митохондрии ответственно за оп-

тимальное количество кальция в клетке [1]. Доказано, что уменьшение избыточного накопления кальция в клетке с помощью лекарственных препаратов группы блокаторов высокопороговых (HVA) кальциевых каналов L-типа, регулируемых G-белками [22] и сопрягающих возбуждения и сокращения в клетках миокарда [20], предотвращает повреждение митохондрий и клеточных мембран во время гипоксии [15], приводит к вазодилатации и улучшению кровоснабжения тканей [25], антиаритмическому, антиангинальному [24], антиоксидантному, тормозящему ремоделирование миокарда и сосудов действию [16].

Рост заболеваемости, инвалидизации и смертности, обусловленные профессиональным и техногенным воздействием вибрации [13], низкая эффективность лечения, экспериментально доказанные феномены нарушения биоэнергетических процессов в различных тканях на фоне вибрации [3, 23], высокая энергоёмкость процессов транспорта ионов кальция [19, 21], его значение для функционирования клетки и наличие группы лекарственных препаратов, способных регулировать процессы клеточного и тканевого кальциевого обмена, позволили определить цель работы.

Целью исследования явилось экспериментальное изучение активности системы энергопродукции кардиомиоцитов кролика в условиях фармакологической коррекции вибрационно-обусловленных нарушений с помощью антагониста кальциевых каналов производного 1,4-дигидро-2,6-диметил-4-(2-нитрофенил)-3,5-пиридиндикарбоновой кислоты диметилового эфира с международным названием нифедипин (INN).

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 95 кроликах-самцах породы *Oryctolagus cuniculus*, *Linnaeus* массой 2,5–3 кг в возра-

сте 3–4 мес. Животные были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.). Все эксперименты выполняли согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики проведения доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ Р 53434-2009) и Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Животные содержались в стандартных условиях вивария по две особи в клетке при температуре 18–23 °С со свободным доступом к воде, пище, при двенадцатичасовом цикле день/ночь.

Действие общей вертикальной вибрации с амплитудой 0,5 мм осуществляли с помощью промышленной установки. Ежедневно в течение 56-ти дней проводили сеансы общей вертикальной вибрации с частотой 44 Гц по 60 мин с 9⁰⁰ до 11⁰⁰ в осенне-зимний период. В качестве средства фармакологической защиты использовали нифедипин («Pliva», Хорватия) в разовой дозе 7,5 мг/кг массы животного (2-я группа), вычисленной с помощью коэффициента перерасчёта равноэффективных доз для разных видов млекопитающих и человека с учётом зависимости между массой тела и относительной площадью его поверхности [2]. Препарат вводили в виде суспензии по 2 мл внутрипищеводно с помощью тонкого эластичного зонда за 60 мин до вибрационного воздействия. Интактные и контрольные животные, которые подвергались воздействию вибрации без фармакологической защиты (1-я группа), получали физ. р-р.

После вскрытия грудной полости животного быстро извлекали сердце, иссекали часть миокарда в области верхушки и помещали в среду выделения фиксированного состава [3, 23], охлаждённую до 0 °С с помощью льда. Для имитации состава внутриклеточной среды использовали апроби-

рованные в других исследованиях [3, 23] сложные солевые растворы. Концентрация компонентов среды выделения: 250 ммоль сахарозы, 10 ммоль Трис-НCl (рН 7,2). Концентрация компонентов среды инкубации: Трис-НCl (рН 7,2) 10 ммоль, 20 ммоль КН₂РO₄, 10 ммоль MgSO₄, 150 ммоль KCl. Сахароза, КН₂РO₄, MgSO₄, KCl («Реахим», Россия); трис-НCl («Serva», Германия). Все растворы готовили *ex tempore* на бидистиллированной воде.

После промывания от крови кусочки ткани сердца массой примерно 250–300 мг помещали в охлаждённый стальной пресс с отверстиями 1 мм и продавливали в калиброванный гомогенизатор Даунса из кварцевого стекла с тефлоновым пестиком при соотношении «среда выделения/ткань» = 1/2. Через 7–10 мин с момента извлечения тканей из организма животного получали 30%-ный гомогенат.

Временной режим забора ткани миокарда, гомогенизации и инкубации был стандартизован и ограничивался 40 мин с момента забоя животного до окончания полярографического измерения показателей активности митохондрий тканей, что соответствовало методическим требованиям обеспечения адекватности статуса митохондрий *in vitro* их «нативному» состоянию, максимально приближенному к состоянию *in vivo* [6].

Энергетический обмен нативных митохондрий сердца в гомогенате изучали полярографическим методом, регистрируя скорости поглощения кислорода митохондриями при 37 °С в 1 мл солевой среды инкубации, уравновешенной с кислородом воздуха. Исходя из того, что для митохондриальных субстратов протонный ток пропорционален скорости дыхания, кислородный электрод позволяет измерять скорость переноса электронов по фермент-субстратным комплексам дыхательной цепи (ДЦ) на кислород на фоне таких скоростьлимитирующих процессов, как транспорт

субстрата через мембрану, активность дегидрогеназ, транспорт адениновых нуклеотидов через мембрану, АТФ-синтезную активность и протонную проводимость мембраны.

Скорость дыхания митохондрий (V) измеряли в $[\text{нг-атом O}] \text{ мин}^{-1} \text{ мг}^{-1} \text{ белка}$. Вклад в эндогенную дыхательную активность митохондрий NAD- и FAD-зависимых субстратов оценивали по данным ингибиторного анализа с амиталом или малонатом [11]. Т. к. амитал, принадлежащий к классу барбитуратов, угнетает окисление NAD-зависимых субстратов за счёт блокирования потока электронов на уровне I фермент-субстратного комплекса ДЦ, обусловленного неспецифическим гидрофобным взаимодействием с ферментом NADH-CoQ-редуктазой, то величина чувствительности скорости эндогенного дыхания (V_3) к амиталу пропорциональна активности этого участка и вкладу эндогенных субстратов, окисляющихся по данному метаболическому пути [11].

Малонат является абсолютным специфическим ингибитором сукцинатдегидрогеназы (СДГ), и после введения его в полярографическую ячейку отсекается та часть эндогенного дыхания, которая определяется вкладом сукцината. Чувствительность эндогенного дыхания (V_3) к ингибиторам вычисляли по формуле: показатель чувствительности к ингибитору = $(1 - V_{\text{инг}}/V_{\text{энд}}) \times 100\%$, где показатель чувствительности к ингибитору — чувствительность эндогенного дыхания к малонату (малонатчувствительность) или амиталу (амиталчувствительность); $V_{\text{инг}}$ ($V_{\text{ам}}$ или $V_{\text{мал}}$) — скорость окисления эндогенных энергетических субстратов в присутствии соответствующего ингибитора в ячейке в концентрации 2 мМ.

Метаболические состояния митохондрий $V_{\text{як}}$ и $V_{\text{глу+мал}}$ «покоя» (состояние 4 — «контролируемое», или «отрегулированное», согласно [11]) моделировали *in vitro*



Рис. 1. Полярографическая измерительная установка состоит из электрода Кларка, ячейки с перемешивающим стержнем, термостатируемого кожуха, водяного термостата I ТЖ-0 03 (Россия), магнитной мешалки ММ-3М (Россия), самописца LKB Bromma 2210 2-Channel Recorder (Швеция).

Fig. 1. The polarographic measuring device consists of a Clarke electrode, a cell with a stirring rod, a thermostatically controlled casing, a water thermostat I TZh-0 03 (Russia), a magnetic stirrer MM-3M (Russia) and a LKB Bromma 2210 2-Channel Recorder (Sweden).

при варьировании экзогенных энергетических субстратов FAD-зависимого — янтарной кислоты 1 мМ или смеси NAD-зависимых субстратов — яблочной и глутаминовой кислот (малат + глутамат) по 3 мМ.

Введением в ячейку разбавителя 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) до 20 мкМ имитировали состояние АТФ-азной «активности» митохондрий (состояние 3 по [11]) и получали показатели $V_{\text{як-р}}$ и $V_{\text{мал+глу-р}}$. Устраняя электрохимический потенциал клеточной мембраны и разбавляя все точки сопряжения в ДЦ, протонофор 2,4-ДНФ нарушает синтез АТФ и его регулирующее влияние в пунктах сопряжения дыхания с фосфорилированием, вследствие чего скорость окисления субстратов возрастает, увеличивается уровень АДФ, тем самым создаётся наиболее высокая функциональная нагрузка на ДЦ [11].

Отклик митохондрий на вибрационный фактор *in vivo* оценивали не только по сово-

купности кинетических (V), но и расчётных регуляторных параметров, которые количественно характеризовали переход митохондрий в разные состояния (от эндогенного дыхания в состояние «покоя»; от «покоя» в «активное» состояние). Для этого в доступных для нашего исследования метаболических состояниях митохондрий дополнительно ввели «регуляторные» коэффициенты приращения субстратного дыхания (КП) в состоянии покоя ($KP_{\text{п}}$) и разобщения ($KP_{\text{р}}$). Рассчитывали коэффициенты стимуляции (КС) и коэффициенты разобщения (КР), например, $КС_{\text{як}} = V_{\text{як}} / V_{\text{з}}$; $KP_{\text{як-р}} = V_{\text{як-р}} / V_{\text{як}}$, где: $КС_{\text{як}}$ — стимуляция эндогенного дыхания экзогенным субстратом янтарной кислотой, $V_{\text{як}}$ — скорость дыхания митохондрий после добавления в полярографическую ячейку сукцината; $КС_{\text{як-р}}$ — стимуляция субстратного дыхания 2,4-ДНФ, $V_{\text{як-р}}$ — скорость окисления янтарной кислоты после добавления 2,4-ДНФ. Коэффициенты приращения и стимуляции выражали в относительных единицах измерения.

Предполагаемое повреждающее действие общей вибрации и защитные свойства лекарственного препарата подтверждали морфогистологически. Обработка гистологического материала (ткань мышцы миокарда левого желудочка в области верхушки) осуществлялась в ходе стандартной гистологической спирто-парафиновой проводки. Окрашивание препаратов производили гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета прикладных программ Excel 2002 («Microsoft Corp.», США), Statistica 6,0 («StatSoft Inc.», США). Значимость межгрупповых различий оценивали параметрическим (t-критерия Стьюдента) и непараметрическим (U-тест Манна–Уитни) критериями в зависимости от типа распределения, который определяли в модуле «Basic Statistica/Tables. Frequency tables» ППП Statistica 6,0.

Результаты и их обсуждение

В ранее опубликованных авторами результатах экспериментального изучения феномена вибрационного воздействия [3] было показано, что с увеличением частоты (от 8 до 44 Гц) и длительности вибрации (от 7-ми, 21-го до 56-ти сеансов) на уровне системы энергопродукции миокарда кроликов вклад активности комплекса NADH-CoQ-редуктаза (I комплекс ДЦ) в энергообеспечение ткани снижался, что согласуется с представлениями о его большей уязвимости [9]. Одновременно активность FAD-зависимого фермент-субстратного комплекса (II комплекс ДЦ), шунтирующего часть электрон-транспортной цепи и обеспечивающего парциальные реакции ДЦ митохондрий с участием эндогенной и экзогенной янтарной кислоты *in vitro* [12], повышалась, свидетельствуя о его ведущей роли в поддержании энергетического обмена в неблагоприятных условиях внешней среды.

Пролонгация воздействия и накопление вибрационной дозы неизменно приводили к гиперактивации системы окисления янтарной кислоты, которая сопровождалась явлениями торможения и разобщения окислительного фосфорилирования, свидетельствуя о формировании низкоэнергетического сдвига в системах энергообеспечения тканей. Подобная функциональная перестройка в ДЦ митохондрий в ответ на вибрацию [23] соответствует аналогичной картине «смены метаболических путей» на фоне других видов неблагоприятных воздействий [9]. Это позволило использовать режим вибрации с определёнными характеристиками (56 сеансов, 44 Гц, 0,5 мм) в качестве неинвазивной модели [4], вызывающей митохондриальную дисфункцию и гипоксический тип клеточного метаболизма [3] для дальнейшего изучения биологических феноменов вибрации и возможностей фармакологической защиты от вибрации

и других неблагоприятных факторов физической природы.

У животных, получавших нифедипин на протяжении 56-ти сеансов вибрации 44 Гц, скорость эндогенного дыхания (V_o) оставалась на уровне интактных животных, тогда как вклад парциальных реакций, по данным ингибиторного анализа, значительно изменялся (рис. 2).

Амиталчувствительность повышалась на 39% ($p < 0,05$) по сравнению с группой вибрированных животных, малонатчувствительность уменьшалась на 40% ($p < 0,05$), приближаясь к показателю интактных животных (рис. 2). При этом коэффициент KP_3 ($KP_3 = \text{мал.ч.}/\text{ам.ч.}$) уменьшался на 56%, что свидетельствовало о преобладании активности комплекса NADH-CoQ-редуктаза в окислительно-восстановительных реакциях, подобно активности у интактных животных.

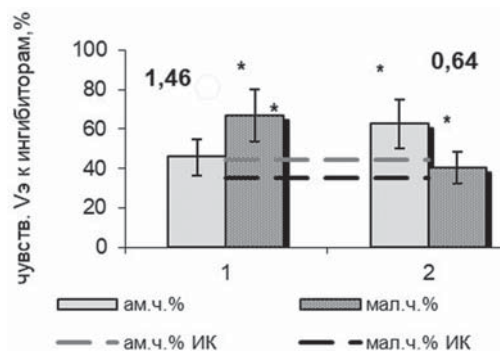


Рис. 2. Влияние нифедипина на соотношение парциальных реакций V_e по данным ингибиторного анализа с амиталом и малонатом.

Примечание: пунктир — интактный контроль (ИК); 1 — вибрация; 2 — вибрация + нифедипин. Цифры возле столбиков диаграмм — KP_3 ; статистически значимые различия между группами 1 и 2: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

Fig. 2. The influence of nifedipine on the ratio of partial reactions V_e according to inhibitory analysis with amytal and malonate.

Note: the dotted line shows intact control (ИК); 1 — vibration; 2 — vibration + nifedipine. The numbers near the bars of the diagrams stand for KP_3 — statistically significant differences between groups 1 and 2: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

Скорость окисления композиции субстратов глутамат + малат в состоянии «покоя» увеличивалась на 27% и приближалась к показателю интактного контроля, тогда как в окислении экзогенной янтарной кислоты наблюдали уменьшение гиперактивации и приближение к границе уровня показателей интактной группы (рис. 3).

Показатели скорости субстратного дыхания ($V_{\text{як}}$ и $V_{\text{глу+мал}}$) в группе с нифедипином оказались выше скорости эндогенного дыхания, свидетельствуя об энергизирующем действии экзогенных субстратов («мягкие» условия инкубации гомогената), большей сохранности физиологической проницаемости мембран для субстратов, трансмембранной разности электрохимического потенциала ионов водорода ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$), способности ферментного комплекса окислять субстраты и готовности последующих участков ДЦ транспортировать электроны

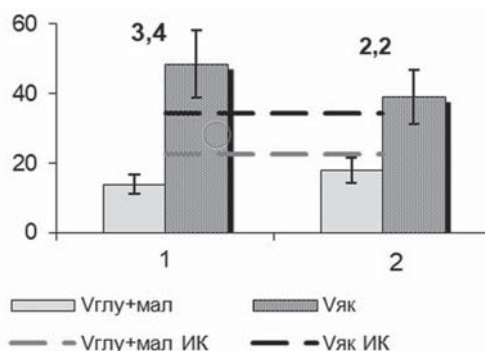


Рис. 3. Влияние нифедипина на скорость окисления NAD- и FAD-зависимых субстратов в состоянии «покоя» в [нг-атом O] $\text{мин}^{-1}\text{мг}^{-1}\text{белка}$ (ось Y).

Примечание: пунктир — интактный контроль (ИК); 1 — вибрация; 2 — вибрация + нифедипин. Цифры возле столбиков диаграмм — KP_3 ; статистически значимые различия между группами 1 и 2: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

Fig. 3. The influence of nifedipine on the rate of oxidation of NAD- and FAD-dependent substrates at rest in [ng-O atom] $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ (Y-axis).

Note: the dotted line shows intact control (ИК); 1 — vibration; 2 — vibration + nifedipine. The numbers near the bars of the diagrams stand for KP_3 ; statistically significant differences between groups 1 and 2: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

к кислороду [6, 11] по сравнению с животными без фармакологической защиты.

Коэффициент KP_n ($KP_n = V_{\text{як}} / V_{\text{глу+мал}}$) снижался на 35% (рис. 3), приближаясь к показателю интактных животных (1,51), что свидетельствовало о сохранности I звена ДЦ при фармакологической защите с одной стороны и о регуляторном сдерживании гиперактивации СДГ — с другой. Коэффициент KP_p ($KP_p = V_{\text{як-р}} / V_{\text{глу+мал-р}}$) уменьшался на 33%, оставаясь выше показателя интактного контроля (0,98) и указывая на отрегулированный режим работы СДГ комплекса на фоне фармакологической защиты.

Однако в метаболическом состоянии «активности» скорость окисления экзогенных NAD-зависимых субстратов в тканях животных, получавших нифедипин, оставалась по-прежнему сниженной по сравнению с показателем интактных животных на 42% ($p < 0,05$); $KP_{\text{глу+мал}}$ уменьшался на 23% ($p < 0,05$) по сравнению с вибрированными животными, что ещё раз подчёркивает необходимость обобщённого анализа совокупности кинетических и расчётных показателей ввиду структурной (белковой, кофакторной) и функциональной сложности организации фермент-субстратных комплексов ДЦ [10, 12].

Как известно, ионы Ca^{2+} , избыточно поступающие в клетку через потенциалзависимые медленные кальциевые каналы, могут подавлять интенсивность дыхания в клетке, усиливать гликолиз, снижать содержание АТФ, разобщать окислительное фосфорилирование, активировать АТФ-потребляющие ферменты. Совокупность изменений, характеризующих метаболические состояния митохондрий миокарда на фоне воздействия вибрации и блокаторов кальциевых каналов, свидетельствует о том, что блокада транспорта ионов Ca^{2+} в клетку на уровне потенциалзависимых ионных каналов L-типа клеточной мембраны оказывает положительное воздей-

ствие на энергетический метаболизм кардиомиоцитов, восстанавливая активность высокоорганизованного стехиометрически продуктивного [10] полиферментного комплекса NADH-CoQ-редуктазы [11, 12]. Этот факт представляется важным, т. к. сайты сопряжения транспорта электронов с образованием высокоэнергетических протонов и стехиометрия этого сопряжения носят фиксированный характер. В частности, I комплекс ДЦ переносит $2H^+/e$, при этом энергия перепада окислительно-восстановительного потенциала протонов ($\Delta\mu_{H^+}$) запасается в виде трансмембранного потенциала $\Delta\psi$, который расходуется на синтез аденозин-5'-трифосфата при помощи протонной АТФ-синтазы митохондрий [12]. Активность и предположительная локализация АТФ-синтазы в структуре системы неспецифического выброса ионов кальция митохондриальной порой (МРТ пора) в качестве каналобразующего компонента внутренней мембраны митохондрий [19] указывает на одну из многочисленных точек сопряжения кальциевого и энергетического обменов.

Параллельно с восстановлением активности I наблюдали регуляторное сдерживание активности СДГ (II) фермент-субстратного комплекса. Многокомпонентное устройство ДЦ, обеспечивающего высокую стехиометрию H^+/O , позволяя субстратам с большим положительным редокс-потенциалом, нежели у пары $NADH^+/NAD^+$ (-320 мВ), переносить восстановительные эквиваленты сразу на II (СДГ-зависимый) участок ДЦ. Подобным образом окисляется один из субстратов цикла Кребса — сукцинат (редокс-потенциал которого $+30$ мВ), донируя электроны в ДЦ на убихинон, минуя I комплекс, не способный полноценно функционировать в условиях гипоксии тканей [9, 12]. К сожалению, этот путь окисления, шунтирующий часть основного потока электронов, не сопряжён с образованием высокоэнергетических

потенциалов и, теоретически, эффективность окислительного фосфорилирования в зоне II фермент-субстратного комплекса в 1,5–2 раза ниже, чем в зоне I (NADH-зависимого) участка ДЦ [10].

Выявленная нами оптимизация работы I митохондриального комплекса, предполагаемая «минимизация» потребления O_2 и АТФ миокардом на фоне применения нифедипина [24] явилась, на наш взгляд, важным элементом его вибропротективного действия, что подтвердилось следующими результатами гистоморфологического анализа ткани. Если неблагоприятные эффекты вибрации неизменно вызывали дистрофию кардиомиоцитов, уменьшение капиллярной сети, спазм артериол, увеличение межклеточного и межпучкового отёка, очаги кровоизлияний и некроза [3, 23], то гистоморфологическая картина ткани миокарда у животных, получавших нифедипин, была более благоприятна. В частности, в кардиомиоцитах наблюдались признаки набухания и зональной дистрофии, признаки компенсаторной реакции в виде гипертрофии отсутствовали, стромально-клеточная реакция была представлена преимущественно лимфоцитарными элементами. Несмотря на то, что степень полнокровия в сосудах сердца оказалась значительно выраженной и отмечались диapedезные кровоизлияния в миокарде, дистрофические изменения были ограничены, признаки некроза ткани миокарда отсутствовали.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Белослудцев К.Н., Дубинин М.В., Белослудцева Н.В., Миронова Г.Д. Транспорт ионов Ca^{2+} митохондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки. *Биохимия*. 2019;84(6):759–775. [Belosludtsev K.N., Dubinin M.V., Belosludtseva N.V., Mironova G.D. Transport ionov Ca^{2+} mitokhondriyami: mekhanizmy, molekulyarnye struktury i znachenie dlya kletki [Mitochondrial Ca^{2+} transport: Mechanisms, molecular structures, and role in cells]. *Biokhimiya* [Biochemistry]. 2019;84(6):759–775. (In Russian)]. DOI: 10.1134/S0320972519060022.
2. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.А., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*. Челябинск: Изд-во Челябинского государственного педагогического университета, 2000:167. [Volchegorskiy I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.A., Tseylikman V.E. *Experimental'noe modelirovanie i laboratornaya otsenka adaptivnykh reaktsiy organizma* [Experimental modeling and laboratory assessment of the adaptive reactions of the body]. Chelyabinsk:

Выводы

На основании проведённой экспериментальной работы можно сделать следующие выводы:

1. Совокупность изменений, характеризующих метаболические состояния митохондрий миокарда на фоне применения нифедипина, свидетельствует о том, что блокада транспорта ионов Ca^{2+} на уровне высокопороговых (HVA) потенциалозависимых ионных каналов L-типа клеточной мембраны влияет на функциональную активность дыхательной цепи кардиомиоцитов.
2. Блокада нифедипином транспорта ионов Ca^{2+} на уровне ионных каналов клеточной мембраны восстанавливает активность I фермент-субстратного комплекса дыхательной цепи.
3. Нифедипин оказывает регуляторное сдерживание активности сукцинатдегидрогеназы в зоне II фермент-субстратного комплекса, предупреждая низкоэнергетический сдвиг в ткани.
4. Блокада кальциевых каналов клеточной мембраны кардиомиоцитов на фоне вибрационного воздействия предотвращает развитие некротических изменений в ткани миокарда экспериментальных животных, свидетельствуя о его кардиопротективном действии.

Результаты данного исследования вошли в грантовые разработки Российского фонда фундаментальных исследований РАН (РФФИ № 10-04-00473, № 13-04-00186).

- Chelyabinsk State Pedagogical University Publ., 2000:167. (In Russian)].
- Воробьева В.В., Шабанов П.Д. Вибрационная модель гипоксического типа клеточного метаболизма, оценённая на кардиомиоцитах кролика. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009;147(6):712–715. [Vorob'eva V.V., Shabanov P.D. Vibratsionnaya model' gipoksicheskogo tipa kletochnoy metabolizma, otsenennaya na kardiomiotsitakh krolika [Vibration model for hypoxic type of cell metabolism evaluated on rabbit cardiomyocytes]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009;147(6):712–715. (In Russian)].
 - Каркищенко Н.Н. *Основы биомоделирования*. М.: ВПК, 2005:608 [Karkishchenko N.N. *Osnovy biomodelirovaniya* [The basics of biomodelling]. Moscow: VPK Publ., 2005:608. (In Russian)].
 - Кирьяков В.А., Павловская Н.А., Лапко И.В., Богатырева И.А., Антошина Л.И., Ошкoderов О.А. Воздействие производственной вибрации на организм человека на молекулярно-клеточном уровне. *Медицина труда и промышленная экология*. 2018;9:34–43. [Kiryakov V.A., Pavlovskaya N.A., Lapko I.V., Bogatyreva I.A., Antoshina L.I., Oshkoderov O.A. Vozdeystvie proizvodstvennoy vibratsii na organizm cheloveka na molekulyarno-kletochnom urovne [Impact of occupational vibration on molecular and cell level of human body]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya* [Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology]. 2018;9:34–43. (In Russian)]. DOI: 10.31089/1026-9428-2018-9-34-43.
 - Кондрашова М.Н. *Аппаратура и порядок работы при полярграфическом измерении дыхания митохондрий. Руководство по изучению биологического окисления полярграфическим методом*. Под ред. М.Н. Кондрашовой. М.: Наука, 1973:50–59. [Kondrashova M.N. *Apparatura i porядok raboty pri polyarograficheskom izmerenii dykhaniya mitokhondriy. Rukovodstvo po izucheniyu biologicheskogo oksileniya polyarograficheskim metodom* [Equipment and procedure for polarographic measurement of mitochondrial respiration. Guidelines for the study of biological oxidation by the polarographic method]. Ed. by M.N. Kondrashova. Moscow: Nauka Publ., 1973:50–59. (In Russian)].
 - Коротенко О.Ю., Панев Н.И., Корчагина Ю.С., Панев Р.Н., Данилов И.П. Формирование патологии внутренних органов у шахтёров с вибрационной болезнью. *Медицина труда и промышленная экология*. 2020;60(6):399–403. [Korotenko O.Yu., Panev N.I., Korchagina Yu.S., Panev R.N., Danilov I.P. Formirovaniye patologii vnutrennikh organov u shakhterov s vibratsionnoy bolezn'yu [Formation of pathology of internal organs in miners with vibration disease]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya* [Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology]. 2020;60(6):399–403. (In Russian)]. DOI: 10.31089/1026-9428-2020-60-6-399-403.
 - Костюк И.Ф., Капустник В.А. Роль внутриклеточного обмена кальция в развитии вазоспастических реакций при вибрационной болезни. *Медицина труда и промышленная экология*. 2004;7:14–18. [Kostyuk I.F., Kapustnik V.A. Rol' vnutrikletochnogo obmena kal'tsiya v razvitiy vazospasticheskikh reaktsiy pri vibratsionnoy bolezn'i [Role of intracellular calcium metabolism in the development of vasospastic reactions in vibration disease]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya* [Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology]. 2004;7:14–18. (In Russian)].
 - Лукьянова Л.Д. *Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты*. М.: Медицина, 2004:520. [Luk'yanova L.D. *Problemy gipoksii: molekulyarnye, fiziologicheskie i meditsinskie aspekty* [Problems of hypoxia: molecular, physiological and medical aspects]. Moscow: Medicina Publ., 2004:520. (In Russian)].
 - Минкевич И.Г. *Стехиометрия метаболических путей в динамике клеточных популяций. Компьютерные исследования и моделирование*. 2011;3(4):455–475. [Minkevich I.G. *Stekhiometriya metabolicheskikh putey v dinamike kletochnykh populyatsiy* [The stoichiometry of metabolic pathways in the dynamics of cellular populations]. *Komp'yuternye issledovaniya i modelirovaniye* [Computer Research and Modeling]. 2011;3(4):455–475. (In Russian)]. DOI: 10.20537/2076-7633-2011-3-4-455-475.
 - Никольс Д. *Биоэнергетика. Введение в хемосмотическую теорию*. М.: Мир, 1985:190. [Nicol's D. *Bioenergetika. Vvedeniye v hemiosmoticheskuyu teoriyu* [Bioenergetics. An Introduction to the chemiosmotic theory]. Moscow: Mir Publ., 1985:190. (In Russian)].
 - Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. *Мембранная биоэнергетика. Уч. пособ.* М.: Изд-во Московского университета, 2010:368. [Skulachev V.P., Bogachev A.V., Kasparinskiy F.O. *Membrannaya bioenergetika*. Textbook. Moscow: Moscow University Press, 2010:368. (In Russian)].
 - Тихонова Г.И., Пиктужанская Т.Е., Горчакова Г.Ю., Чуранова А.Н., Брылева А.С. Влияние длительности и интенсивности воздействия производственных факторов на уровни смертности шахтёров-угольщиков. *Медицина труда и промышленная экология*. 2018;7:16–21. [Tikhonova G.I., Piktushanskaya T.E., Gorchakova T.Yu., Churanova A.N., Bryleva M.S. Vliyaniye dlitel'nosti i intensivnosti vozdeystviya proizvodstvennykh faktorov na urovni smertnosti shakhterov-ugol'shchikov [Influence of duration and intensity of exposure to occupational hazards on mortality levels of coal miners]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya* [Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology]. 2018;7:16–21. (In Russian)]. DOI: 10.31089/1026-9428-2018-7-16-21.

14. Третьяков С.В., Шпагина Л.А. Перспективы изучения структурно-функционального состояния сердечно-сосудистой системы у больных вибрационной болезнью в сочетании с артериальной гипертензией. *Медицина труда и промышленная экология*. 2017;12:30–34. [Tret'yakov S.V., Shpagina L.A. *Perspektivy izucheniya strukturno-funktional'nogo sostoyaniya serdechno-sosudistoy sistemy u bol'nykh vibratsionnoy bolezni'yu v sochetanii s arterial'noy gipertenziey* [Prospects of studying structural and functional state of cardiovascular system in vibration disease patients with arterial hypertension]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya* [Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology]. 2017;12:30–34. (In Russian)].
15. Abernethy D.R., Soldatov J. Structure-functional diversity of human L-type Ca²⁺ channel: Perspectives for new pharmacological targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002;300(3):724–728. DOI: 10.1124/jpet.300.3.724.
16. Chernorudskiy A.L., Zito E. Regulation of calcium homeostasis by ER redox: a close-up of the ER/mitochondria connection. *J. Mol. Biol.* 2017;429(5):620–632. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.01.017.
17. Hirabayashi Y., Kwon S.K., Paek H., Pernice W.M., Paul M.A., Lee J., Erfani P., Raczkowski A., Petrey D.S., Pon L.A., Polleux F. ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca²⁺ dynamics in mammalian neurons. *Science*. 2017;358(6363):623–630. DOI: 10.1126/science.aan6009.
18. Hrynevich S.V., Waseem T.V., Fedorovich S.V. Estimation of the mitochondrial calcium pool in rat brain synaptosomes using Rhod-2 AM fluorescent dye. *Biophysica*. 2017;62(1):75–78. DOI: 10.1134/S0006350917010079.
19. Leung A.W., Waranyuwatana P., Halestrap A.P. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J. Biol. Chem.* 2008;283(39):26312–26323. DOI: 10.1074/jbc.M805235200.
20. Pogzig H., Becher C. Voltage-dependent cooperative interactions between Ca-channel blocking drugs in intact cardiac cell. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1989;560(1):306–308. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1989.tb24110.x.
21. Raturi A., Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim. Biophys. Acta*. 2013;1833(1):213–224. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.04.013.
22. Tkachuk V.A., Avakian A.E. Molecular mechanisms of G-proteins with membrane receptors and second messenger systems. *Russian Journal of Physiology*. 2008;89(12):1478–1490.
23. Vorobieva V.V., Shabanov P.D. Exposure to whole body vibration impairs the functional activity of the energy producing system in rabbit myocardium. *Biophysica*. 2019; 64(2):251–255. DOI: 10.1134/S0006350919020210.
24. Wappl E., Mitterdorfer J., Glossmann H., Striessnig J. Mechanism of dihydropyridine interaction with critical binding residues of L-type Ca²⁺ channel alpha 1 subunits. *J. Biol. Chem.* 2001;276(16):12730–12735. DOI: 10.1074/jbc.M010164200.
25. Widerberg A., Bergman S., Danielsen N., Lundborg G., Dahlin L.B. Nerve injury induced by vibration: prevention of the effect of a conditioning lesion by D 600, Ca²⁺ channel blocker. *Occup. Environ. Med.* 1997;54(5):312–315. DOI: 10.1136/oem.54.5.312.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Воробьева Виктория Владимировна*, д.м.н., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России;
e-mail: v.v.vorobeva@mail.ru

Левченкова Ольга Сергеевна, к.м.н., доц., ФГБВОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: levchenkova-o@yandex.ru

Шабанов Пётр Дмитриевич, д.м.н., проф., ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России;
e-mail: pdshabanov@mail.ru

Viktoriya V. Vorobieva*, Dr. Sci. (Med.), Institute of Experimental Medicine, Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia;
e-mail: v.v.vorobeva@mail.ru

Olga S. Levchenkova, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Smolensk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: levchenkova-o@yandex.ru

Petr D. Shabanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Institute of Experimental Medicine, Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia;
e-mail: pdshabanov@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФЕНОЛСОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЕЙ РЯБИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*SORBUS AUCUPARIA L.*) В ОНКОЛОГИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

О.Ю. Рыбалкина^{1*}, Т.Г. Разина¹, Е.А. Киселева¹, Г.И. Калинкина², Н.В. Исайкина²,
Е.П. Зуева¹, В.В. Жданов¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра» РАН 634028, Российская Федерация, Томск, пр. Ленина, 3

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

Рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia L.*) является ярким представителем фенолсодержащих лекарственных растений. Широко распространённое и культивируемое растение имеет достаточную сырьевую базу не только плодов, но и других частей растения (листьев, цветков); является перспективным источником биологически активных комплексов для разработки новых лекарственных средств. В работе установлено содержание основных групп фенольных соединений в экстрактах из плодов, листьев и цветков *S. aucuparia L.*, которые получали по оригинальной технологии подкисленным 95%-ным этанолом. Определяли содержание суммы фенольных соединений, а также флавоноидов, в т. ч. антоцианов, фенолокислот, дубильных веществ. Изучено влияние данных фенолсодержащих экстрактов на развитие перевиваемых опухолей (карцинома легких Льюис, рак лёгкого-67) и эффективность лечения циклофосфаном. Выявлено, что использование растительных комплексов приводит к достоверной ингибции развития метастазов в лёгких, а также повышению противоопухолевой и противометастатической активности циклофосфана в комбинированном лечении. Полученные новые данные представляют интерес для дальнейшего изучения этих фенолсодержащих комплексов с целью создания на их основе лекарственных средств для повышения эффективности химиотерапии злокачественных новообразований.

Ключевые слова: рябина обыкновенная, фенольные соединения, перевиваемые опухоли, циклофосфан

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Рыбалкина О.Ю., Разина Т.Г., Киселева Е.А., Калинкина Г.И., Исайкина Н.В., Зуева Е.П., Жданов В.В. Оценка эффективности использования фенолсодержащих комплексов из различных частей рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia L.*) в онкологическом эксперименте. *Биомедицина*. 2022;18(4):74–85. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-74-85>

Поступила 06.04.2022

Принята после доработки 27.09.2022

Опубликована 10.12.2022

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF PHENOL-CONTAINING COMPLEXES EXTRACTED FROM DIFFERENT PARTS OF *SORBUS AUCUPARIA L.* IN AN ONCOLOGICAL EXPERIMENT

Olga Yu. Rybalkina^{1*}, Tatyana G. Razina¹, Elena A. Kiseleva¹, Galina I. Kalinkina²,
Nadezhda V. Isaikina², Elena P. Zueva¹, Vadim V. Zhdanov¹

¹ Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine of Tomsk National Research
Medical Center of the Russian Academy of Sciences
634028, Russian Federation, Tomsk, Lenina Ave., 3

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

Mountain ash (*Sorbus aucuparia L.*) is a prominent representative of phenolic medicinal plants. A widespread and cultivated plant, it has a sufficient raw material base not only of fruits, but also of other parts of the plant (leaves, flowers); it is a promising source of biologically active complexes for the development of new medical drugs. In the work, the content of the main groups of phenolic compounds in plant extracts from fruits, leaves and flowers of *S. aucuparia L.* was determined. Extracts were obtained using the original technology with acidified 95% ethanol. The content of the sum of phenolic compounds was determined, as well as the content of anthocyanins, flavonoids, phenolic acids, tannins. The effect of these phenol-containing complexes on the development of transplanted tumors (Lewis lung carcinoma, lung cancer-67) and the effectiveness of cyclophosphane treatment were studied. It was revealed that the use of plant complexes leads to a significant inhibition of the development of metastases in the lungs, as well as an increase in the antitumor and anti-metastatic activity of cyclophosphane in combined treatment. The new data obtained are of interest for further study of these phenol-containing complexes in order to create drugs based on them to increase the effectiveness of chemotherapy for malignant neoplasms.

Keywords: mountain ash, phenolic compounds, transplantable tumors, cyclophosphamide

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

For citation: Rybalkina O.Yu., Razina T.G., Kiseleva E.A., Kalinkina G.I., Isaikina N.V., Zueva E.P., Zhdanov V.V. Evaluation of the Efficiency of Phenol-Containing Complexes Extracted from Different Parts of *Sorbus Aucuparia L.* in an Oncological Experiment. *Journal Biomed.* 2022;18(4):74–85. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-74-85>

Submitted 06.04.2022

Revised 27.09.2022

Published 10.12.2022

Введение

Злокачественные новообразования являются одной из основных причин смертности в мире, в т. ч. и в России. Смертность от рака, по прогнозам ВОЗ, будет продолжать расти, и к 2030 г. превысит 11 млн случаев в год. Ежегодно в России выявляется около 500 тыс. человек с впервые установленным онкологическим диагнозом, более половины из них получают химиотерапию. Внедрение новых схем медикаментозной терапии позволяет значительно увеличить продолжительность жизни пациентов.

В то же время основным недостатком химиотерапии является высокая токсичность препаратов, делающая невозможным увеличение дозы для полного уничтожения опухолевых клеток и уменьшения их инвазивной активности [8]. Из-за малой терапевтической широты цитостатическая терапия приводит к побочным эффектам даже в дозах, рекомендованных для клинического применения. Особую проблему в онкологии представляют микроскопические очаги опухолевого роста, которые в дальнейшем превращаются в метастазы. В настоящее

время на мировом фармацевтическом рынке представлено большое количество цитостатиков, однако по-прежнему актуальным является поиск средств дополнительной терапии, обладающих способностью ингибировать рост опухоли и метастазов, а также повышать эффективность химиотерапии и снижать её побочные проявления. Предпочтение отдаётся композициям из лекарственного растительного сырья, которые, как правило, не обладают токсическими свойствами, экономически выгодны, отличаются широким спектром действия. Многочисленными экспериментальными исследованиями доказана целесообразность использования в схемах цитостатического лечения препаратов природного происхождения [11], при этом наибольший интерес представляют лекарственные растения, в которых основная роль в проявляемых эффектах принадлежит фенольным соединениям, в частности антоцианам [7].

Ярким представителем фенолсодержащих лекарственных растений является рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia L.*) — широко распространённое в природе и культивируемое растение; имеет достаточную сырьевую базу не только плодов, но и других частей растения (листья, цветков); является перспективным источником биологически активных комплексов для разработки новых лекарственных средств [22, 23]. Согласно Государственной Фармакопее РФ, *S. aucuparia L.* является официальным лекарственным растением [3], плоды которого входят в состав витаминного сбора № 2 в качестве поливитаминного средства [2].

Фармакологическая активность каждой части растения зависит от количественного содержания и характера биологически активных веществ, в частности фенольных соединений. В плодах, листьях и цветках *S. aucuparia L.* содержатся такие фенольные соединения, как различные классы флавоноидов, дубильные вещества [9]. Именно фенольный состав растительного сырья

S. aucuparia L. представляет наибольший интерес для медицинской практики, поскольку эти вещества существенно влияют на метаболизм опухолевых клеток, что приводит к подавлению опухолевого роста [20]. Многочисленные экспериментальные данные указывают на возможность повышения эффективности химиотерапии растительными препаратами, содержащими фенольные соединения [4]. Кроме того, комплекс биологически активных веществ (БАВ) различных частей *S. aucuparia L.*, обладающих индивидуальными свойствами и способностью усиливать действие друг друга, определяют возможность воздействия на различные звенья патологического процесса. Имеются сведения об ингибирующем влиянии флавоноидов растений на пролиферацию и метастазирование опухолевых клеток [1]. Таким образом, **целью работы** явилось изучить влияние фенолсодержащих комплексов (ФСК), полученных из плодов, листьев и цветков *S. aucuparia L.* на развитие переносимых опухолей и эффективность цитостатического лечения; определить содержание основных групп фенольных соединений в данных растительных комплексах.

Материалы и методы

Для получения жидких экстрактов, содержащих комплекс фенольных соединений, использовали цветки, листья и плоды *S. aucuparia L.* (сем. *Rosaceae*), произрастающей в окрестностях г. Томска и собранных в 2019 г.: цветки — в период цветения растения; плоды и листья — в период полного созревания плодов. Сырьё сушили тепловой конвекторной сушкой при температуре 40–50 °С до воздушно-сухого состояния.

ФСК из плодов, цветков и листьев *S. aucuparia L.* получали по оригинальной технологии методом динамической дробной мацерации. Для получения экстрактов использовали лабораторный реактор с паровой рубашкой («Radleys», Германия). Сырьё рябины измельчали до размера ча-

стиц диаметром 0,3–0,5 см. Экстракты готовили в соотношении 1:5 спиртом этиловым 95%-ным, содержащим 1% кислоты хлористоводородной концентрированной. Экстракт плодов рябины обыкновенной на 95%-ном подкисленном спирте представляет собой тёмно-вишнёвую жидкость со специфическим фруктовым запахом кисло-горького вкуса; аналогичные экстракты цветков рябины обыкновенной — жидкость вишнёвого цвета, экстракт листьев рябины обыкновенной — жидкость бурого цвета (присутствие хлорофилла).

Выбор экстрагента обусловлен необходимостью максимального извлечения из сырья группы фенольных соединений, в т. ч. производных флавана — катехинов и лейкоцианидинов [18], которые в процессе получения ФСК окисляются до антоцианов.

Для исследования химического состава растительных комплексов использовали общепринятые методики спектрофотометрического анализа, основанные на измерении оптической плотности БАВ: антоцианидины и фенолоксилоксины определяли методом прямой спектрофотометрии в расчёте на цианидин-3-О-глюкозид и хлорогеновую кислоту соответственно. Содержание антоцианидинов в растительных комплексах определяли по удельному показателю поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) цианидин-3-О-глюкозида, который при длине волны 542 ± 2 нм составляет 100 [1]. Содержание фенолоксилоксины определяли по удельному показателю поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) кислоты хлорогеновой, который при длине волны 327 ± 2 нм составляет 507. Флавоноиды определяли методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием реакции комплексообразования с 5%-ным спиртовым р-ром алюминия хлорида. Расчёт суммы флавоноидов проводили с использованием удельного показателя поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) комплекса р-ра стандартного образца рутина с алюминия хлоридом при длине волны 415 нм равного 260 (ГФ). Показания снимали на спек-

трофотометре СФ-2000 (Россия). Сумму фенольных соединений и дубильные вещества определяли методом перманганатометрического титрования с осаждением последних р-ром желатина [18].

Эксперименты по оценке влияния фенолсодержащих комплексов из *S. aucuparia* L. на развитие опухолей и метастазов выполнены на 130 мышах-самках линии С57BL/6 (массой 20–21 г в возрасте 3 мес.), полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ. Мыши конвенциональные 1-й категории (сертификат качества № 188-05). Содержание животных осуществляли по правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Эксперименты проведены в соответствии с приказом Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», Федеральным законом «О лекарственных средствах», «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [10], «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2013 г.). Дизайн экспериментов одобрен Этическим комитетом НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Метастазирующие гематогенно опухоли — карциному лёгких Льюис (LLC) и рак лёгкого-67 (РЛ-67) — перевивали внутримышечно по 5×10^6 клеток в 0,1 мл физ. р-ра [13]. Исследуемые ФСК деалкоголизировали на водяной бане и вводили мышам внутрижелудочно в дозах 1 и 5 мг/кг ежедневно с 7-х сут после перевивки опухолей в течение 9–11-ти сут. В экспериментах применяли алкилирующий цитостатический препарат циклофосфан (ЦФ) производства ОАО «Биохимик» (Россия), который вводили мышам однократно внутрибрюшинно в дозе 125 мг/кг на 11-е сут после трансплантации опухолей.

По окончании экспериментов мышей умерщвляли дислокацией шейного отдела позвоночника, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», утверждённые Министерством здравоохранения РФ. Определяли массу первичной опухоли, подсчитывали количество и площадь метастазов в лёгких, вычисляли торможение роста опухоли, частоту метастазирования и индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) в процентах [10].

Количественные показатели представлены в виде $X \pm m$, где X — среднее значение, m — стандартная ошибка среднего. Для качественных признаков указывалась относительная величина в %. Обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрических критериев Вилкоксона—Манна—Уитни (U) и углового преобразования Фишера (ϕ) (программное обеспечение Statistica). Различия считали достоверными при $p < 0,05$ [6].

Результаты исследований

По данным химического анализа, фенольные соединения растительных комплексов из плодов, листьев, цветков *S. aucuparia L.* представлены флавоноидами, в т. ч. антоцианидинами, фенолокислотами и дубильными веществами (табл. 1).

Лидирующим по содержанию суммы фенольных соединений является ФСК пло-

дов: содержание этих БАВ в сухом остатке превышало таковые в ФСК листьев и цветков в 2,2 и 1,6 раза соответственно. Из трёх представленных для анализа экстрактов максимальное количество антоцианидинов и фенолокислот также регистрировалось в ФСК плодов, хотя в ФСК листьев и цветков они присутствовали в достаточном количестве для проявления фармакологических эффектов. Показано, что по количеству дубильных веществ доминирующую позицию занял ФСК листьев, превосходя по количеству этих БАВ ФСК плодов и цветков в 4,4 и 4,2 раза (табл. 1). Таким образом, полученные результаты подтверждают обоснованность нашего интереса к плодам, листьям и цветкам *S. aucuparia L.*, как к дополнительным источникам лекарственных средств для повышения эффективности химиотерапии опухолей.

В экспериментах на мышах-самках линии C57BL/6 с карциномой лёгких Льюис выявлено уменьшение массы первичной опухоли под влиянием фенолсодержащих комплексов плодов и листьев *S. aucuparia L.*, вводимых в дозах 1 и 5 мл/кг: ТРО составило 12–27%. Кроме того, обнаружено достоверное ингибирующее влияние растительных комплексов на развитие метастатического процесса. Так, при введении мышам ФСК плодов в дозе 1 мл/кг количество метастазов в лёгких и их площадь оказались меньше в 1,8 и 3,3 раза. При использовании ФСК цвет-

Таблица 1. Результаты определения фенольных соединений в растительных комплексах плодов, листьев, цветков *Sorbus aucuparia L.*, полученных спиртом этиловым 95%-ным, содержащим 1% кислоты хлористоводородной концентрированной

Table 1. Determination of phenolic compounds in plant complexes from berries, leaves and flowers of *Sorbus aucuparia L.* extracted with ethyl alcohol 95% containing 1% concentrated hydrochloric acid

| Объект исследования | ФСК плодов | ФСК листьев | ФСК цветков |
|---|--|-------------|-------------|
| БАВ | Содержание, % на сухой остаток экстракта | | |
| Сумма фенольных соединений | 7,30±0,37 | 3,25±0,20 | 4,54±0,20 |
| Флавоноиды, в расчёте на рутин | 0,11±0,01 | 0,37±0,01 | 0,65 ±0,03 |
| Антоцианидины, в расчёте на цианидин-3-О-глюкозид | 3,30±0,20 | 2,59±0,10 | 2,41±0,12 |
| Фенолокислоты, в расчёте на хлорогеновую кислоту | 2,97±0,15 | 1,79±0,06 | 1,82±0,08 |
| Дубильные вещества | 0,19±0,01 | 0,84±0,01 | 0,20±0,00 |

ков число метастатических узлов достоверно снизилось в 2,4 (1 мл/кг) и 2,2 (5 мл/кг) раза, при этом площадь метастатического поражения уменьшилась в 5,8 и 3,6 раза соответственно. ФСК листьев в дозе 5 мл/кг оказывал тормозящее влияние на развитие метастазов, уменьшая их количество (в 2,3 раза) и площадь (в 6,8 раза) по сравнению с показателями у мышей контрольной группы. В этой группе мышей отмечено снижение частоты метастазирования опухоли со 100% в контроле до 75% у получавших ФСК листьев (табл. 2).

Применение циклофосфана в экспериментах в указанном режиме привело к умеренному ингибирующему влиянию на рост первичного опухолевого узла: ТРО в представленных сериях не превышало 47%. Под действием цитостатика наблюдалась ингибция развития гематогенных метастазов (табл. 2).

При добавлении в схему химиотерапии растительных комплексов *S. aucuparia L.* отмечено существенное повышение противометастатического действия циклофосфана. Так, у животных, получавших фенолсодержащий комплекс плодов, многократно меньше оказалось как количество, так и площадь метастатического поражения лёгких. Частота метастазирования в группах сочетанного использования цитостатика и ФСК плодов в дозах 1 и 5 мл/кг составила 20 и 38% соответственно против 90% у мышей группы монокимиотерапии, ИИМ достигал 99% (табл. 2).

При введении циклофосфана совместно с ФСК листьев в дозе 5 мл/кг выявлено достоверное уменьшение всех показателей процесса диссеминации: частота метастазирования составила 63% против 100%, количество метастазов снизилось в 7,4 раза, их площадь оказалась в 12,7 раза меньше, чем у животных группы монокимиотерапии, при этом индекс ингибирования метастазирования составил 95%. Если же совместно с цитостати-

ком вводили ФСК листьев в дозе 1 мл/кг, метастазы в лёгких мышей полностью отсутствовали (табл. 2).

Использование цитостатика и ФСК цветков *S. aucuparia L.* в дозах 1 и 5 мл/кг вызывало достоверное уменьшение как количества (в 3,3 и 3,8 раза), так и площади (в 3,4 и 8,0 раза) метастазов в лёгких; ИИМ составил 94 и 97% соответственно. Кроме того, у мышей, получавших на фоне химиотерапии этот фенолсодержащий комплекс в дозе 5 мл/кг, достоверно ниже оказалась частота метастазирования — 44% против 89% у получавших только цитостатик (табл. 2).

У мышей с РЛ-67, получавших изучаемые фенолсодержащие комплексы в изолированном режиме введения, масса первичной опухоли не отличалась от контрольных значений. У животных с опухолью, получавших ФСК плодов, листьев и цветков *S. aucuparia L.*, в обеих изучаемых дозах наблюдалось достоверное ингибирующее влияние на процесс метастазирования, судя по количеству метастатических узлов в лёгких и площади поражения. Анализ индекса ингибирования метастазирования в % — интегрального показателя угнетения процесса диссеминации, позволил выстроить ряд его значений по мере увеличения противометастатического эффекта: 31 (ФСК листьев, 1 мл/кг) < 38 (ФСК цветков, 5 мл/кг) < 53 (ФСК листьев, 5 мл/кг) < 55 (ФСК плодов, 5 мл/кг) < 67 (ФСК цветков, 1 мл/кг) < 77 (ФСК плодов, 1 мл/кг).

В то же время, если цитостатик не оказал ингибирующего влияния на опухолевый узел, то при добавлении в схему химиотерапии ФСК из листьев наблюдалось торможение роста первичной опухоли относительно показателя в группе монокимиотерапии.

При анализе метастазирования РЛ-67 выявлено, что у животных, получавших только цитостатик, наблюдалось снижение количества и площади метастазов в лёгких. При использовании фенолсодержащего

Таблица 2. Влияние фенолсодержащих комплексов плодов, листьев, цветков *Sorbus aucuparia L.* на развитие LLC у мышей-самок линии C57BL/6 и эффективность лечения циклофосфаном

Table 2. Effect of phenol-containing complexes extracted from berries, leaves and flowers of *Sorbus aucuparia L.* on the development of LLC in C57BL/6 female mice and the effectiveness of treatment with cyclophosphamide

| Группа наблюдения, доза×количество введений (количество животных) | Масса опухоли (X±m), г | Торможение роста опухоли, % | Частота метастазирования, % | Количество метастазов на 1 мышь (X±m) | Площадь метастазов на 1 мышь (X±m), мм ² | ИИМ, % |
|---|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------------|---|--------|
| ФСК плодов | | | | | | |
| 1. Контроль (9) | 6,20±0,22 | – | 100 | 20,9±2,5 | 29,1±6,1 | – |
| 2. ЦФ, 125 мг/кг×1 (10) | 3,91±0,40 p ₁₋₂ <0,01 | 37 | 90 | 6,4±2,3 p ₁₋₂ <0,01 | 1,4±0,8 p ₁₋₂ <0,01 | 72 |
| 3. ФСК плодов, 1 мл/кг×12 (10) | 5,46±0,24 p ₁₋₃ <0,05 | 12 | 100 | 11,7±1,2 p ₁₋₃ <0,01 | 8,7±1,1 p ₁₋₃ <0,01 | 44 |
| 4. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК плодов, 1 мл/кг×12 (10) | 3,42±0,46 | 45 | 20 p ₂₋₄ <0,01 | 0,6±0,4 p ₂₋₄ <0,01 | 0,04±0,03 p ₂₋₄ <0,01 | 99 |
| 5. ФСК плодов, 5 мл/кг×12 (10) | 4,95±0,20 p ₁₋₅ <0,01 | 20 | 100 | 18,1±4,0 | 24,9±11,6 | 13 |
| 6. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК плодов, 5 мл/кг×12 (8) | 3,25±0,40 | 48 | 38 p ₂₋₆ <0,01 | 0,4±0,2 p ₂₋₆ <0,01 | 0,12±0,01 p ₂₋₆ <0,01 | 99 |
| ФСК листьев | | | | | | |
| 1. Контроль (9) | 4,30±0,23 | – | 100 | 17,3±4,4 | 28,0±20,6 | – |
| 2. ЦФ, 125 мг/кг×1 (10) | 2,29±0,33 p ₁₋₂ <0,01 | 47 | 100 | 11,1±1,0 | 3,8±0,9 p ₁₋₂ <0,01 | 36 |
| 3. ФСК листьев, 1 мл/кг×10 (10) | 3,29±0,28 p ₁₋₃ <0,01 | 23 | 100 | 13,5±2,7 | 9,5±2,9 | 22 |
| 4. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК листьев, 1 мл/кг×10 (8) | 2,55±0,14 | 41 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 5. ФСК листьев, 5 мл/кг×10 (8) | 3,14±0,22 p ₁₋₅ <0,01 | 27 | 75 p ₁₋₅ <0,01 | 7,5±2,4 p ₁₋₅ <0,01 | 4,1±1,1 p ₁₋₅ <0,05 | 67 |
| 6. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК листьев, 5 мл/кг×10 (8) | 2,19±0,23 | 49 | 63 p ₂₋₆ <0,01 | 1,5±0,5 p ₂₋₆ <0,01 | 0,3±0,2 p ₂₋₆ <0,01 | 95 |
| ФСК цветков | | | | | | |
| 1. Контроль (11) | 4,29±0,27 | – | 100 | 18,3±2,6 | 28,4±8,2 | – |
| 2. ЦФ, 125 мг/кг×1 (9) | 2,59±0,29 p ₁₋₂ <0,01 | 40 | 89 | 4,9±1,0 p ₁₋₂ <0,01 | 2,4±1,1 p ₁₋₂ <0,01 | 76 |
| 3. ФСК цветков, 1 мл/кг×11 (10) | 4,34±0,29 | –1 | 90 | 7,6±1,6 p ₁₋₃ <0,01 | 4,9±1,4 p ₁₋₃ <0,01 | 63 |
| 4. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК цветков, 1 мл/кг×11 (10) | 3,11±0,23 | 28 | 70 p ₁₋₄ <0,01 | 1,5±0,5 p ₂₋₄ <0,01 | 0,7±0,4 p ₂₋₄ <0,05 | 94 |
| 5. ФСК цветков, 5 мл/кг×11 (10) | 4,41±0,17 | –3 | 100 | 8,2±2,0 p ₁₋₅ <0,01 | 7,8±2,1 p ₁₋₅ <0,05 | 55 |
| 6. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК цветков, 5 мл/кг×11 (9) | 2,49±0,22 | 42 | 44 p ₂₋₆ <0,01 | 1,3±0,7 p ₂₋₆ <0,05 | 0,3±0,3 p ₂₋₆ <0,05 | 97 |

Примечание: в таблицах 2–3 нижним индексом после уровня значимости *p* указаны номера сравниваемых групп.
Note: in Tables 2–3, the numbers of the compared groups are indicated before the significance level *P*.

комплекса плодов *S. aucuparia L.* совместно с циклофосфаном достоверно меньше оказались все показатели процесса диссеминации. Так, единичные метастазы в лёгких отмечены у 10 и 38% мышей, получавших циклофосфан совместно с ФСК плодов в дозах 1 и 5 мл/кг, ИИМ составил 99 и 62%

соответственно. Аналогичные результаты получены при включении в схему химиотерапии ФСК листьев *S. aucuparia L.* У животных, которым вводили совместно с цитостатиком ФСК цветков в дозах 1 и 5 мл/кг, количество метастазов уменьшилось в 4,8 и 4,4 раза (*p*<0,05); а их площадь — в 8,0

($p < 0,05$) и 12,0 раза соответственно, относительно этих данных у леченных только циклофосфаном. Частота метастазирования в группе мышей, получавших на фоне цитостатика ФСК в дозе 1 мл/кг, снизилась до 40 от 75% ($p < 0,01$) в группе монокимиотерапии; уменьшение этого показателя у получавших в схеме химиотерапии ФСК цветков в дозе 5 мл/кг (55%) носило характер тенденции; ИИМ составил 97 и 95% соответственно (табл. 3).

Обсуждение результатов

Выявленная фармакологическая активность растительных комплексов плодов, цветков и листьев *S. aucuparia L.* может определяться набором биологически активных веществ, в частности фенольных соединений, которые не только обладают индивидуальными свойствами, но и усиливают действие друг друга [15]. Химический анализ изучаемых фенолсодержащих комплексов показал, что в их состав входит большое количество флавоноидов, в т. ч. антоцианидинов, обладающих широким спектром фармакологической активности.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности существенного повышения противометастатического действия циклофосфана фенолсодержащими комплексами плодов, листьев и цветков *S. aucuparia L.* Возможным механизмом, лежащим в основе повышения эффективности химиотерапии, является способность фенольных соединений препятствовать избыточной генерации свободных радикалов, образованных в результате метаболизма циклофосфана, что приводит к увеличению защитной реакции организма. Согласно данным литературы, антиоксидантные свойства присущи флавоноидам, в т. ч. и антоцианам: благодаря фенольной структуре и наличию гидроксильных групп в углеродных кольцах они напрямую связывают активные кислородные радикалы, вступая во взаимодействие с ними и приводя к ста-

билизации молекул, тем самым защищая ДНК здоровых клеток от повреждающего воздействия интермедиантов и продуктов перекисного окисления липидов [16, 24]. Напротив, в опухолевых клетках некоторые флавоноиды снижают активность антиоксидантных ферментов, что приводит к развитию окислительного стресса и способствует их апоптозу [12].

Следует отметить также способность изучаемых растительных комплексов самостоятельно тормозить развитие первичного опухолевого узла. Одним из механизмов, лежащих в основе противоопухолевого действия растительных экстрактов, богатых флавоноидами, в т. ч. антоцианами, является их воздействие на протеины – регуляторы клеточного цикла (p53, p21, p27, циклин D 1, циклин A), в результате чего подавляется деление опухолевых клеток [5, 13, 14, 17, 21].

Помимо противоопухолевого действия изучаемых фенолсодержащих комплексов плодов и листьев *S. aucuparia L.*, в проведенных экспериментах показана антиметастатическая активность этих растительных комплексов. По-видимому, в механизме противометастатического действия имеет значение антиангиогенный эффект антоцианов, который опосредуется несколькими механизмами: угнетением экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), стимулирующего рост кровеносных сосудов, васкуляризацию опухолей и их метастазирование; и подавлением экспрессии рецепторов VEGF на эндотелиальных клетках через ингибирование активации сигнального пути STAT3 [19]. Помимо этого, известно, что флавоноиды оказывают не только прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки, но и, что не менее важно, стимулируют реакции иммунитета, устраняют гиперкоагуляцию, корректируют нарушения обмена веществ, что имеет прямое отношение к противометастатическому действию [4].

Таблица 3. Влияние фенолсодержащих комплексов плодов, листьев, цветков *Sorbus aucuparia L.* на развитие РЛ-67 у мышей-самок линии C57BL/6 и эффективность лечения циклофосфаном
Table 3. Effect of phenol-containing complexes extracted from berries, leaves and flowers of *Sorbus aucuparia L.* on the development of RL-67 in female mice of the C57BL/6 line and the effectiveness of treatment with cyclophosphamide

| Группа наблюдения, доза/количество введений (количество животных) | Масса опухоли (X±m), г | Торможение роста опухоли, % | Частота метастазирования, % | Количество метастазов на 1 мышшь (X±m) | Площадь метастазов на 1 мышшь (X±m), мм ² | ИИМ, % |
|---|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--|--|--------|
| ФСК плодов | | | | | | |
| 1. Контроль (10) | 2,76±0,45 | – | 100 | 9,1±1,4 | 9,7±3,9 | – |
| 2. ЦФ, 125 мг/кг×1 (10) | 2,09±0,28 | 24 | 100 | 4,5±0,7 p ₁₋₂ <0,01 | 0,6±0,2 p ₁₋₂ <0,01 | 51 |
| 3. ФСК плодов, 1 мл/кг×12 (10) | 3,20±0,45 | –16 | 50 p ₁₋₃ <0,01 | 4,1±1,7 p ₁₋₃ <0,05 | 3,6±2,1 p ₁₋₃ <0,01 | 77 |
| 4. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК плодов, 1 мл/кг×12 (10) | 2,85±0,40 | –3 | 10 p ₂₋₄ <0,01 | 0,2±0,2 p ₂₋₄ <0,01 | 0,02±0,01 p ₂₋₄ <0,01 | 99 |
| 5. ФСК плодов, 5 мл/кг×12 (10) | 2,39±0,22 | 13 | 80 p ₁₋₅ <0,01 | 5,1±1,6 p ₁₋₅ <0,05 | 0,6±0,4 p ₁₋₅ <0,01 | 55 |
| 6. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК плодов, 5 мл/кг×12 (8) | 2,04±0,40 | 26 | 38 p ₂₋₆ <0,01 | 0,9±0,5 p ₂₋₆ <0,05 | 0,06±0,04 p ₂₋₆ <0,05 | 62 |
| ФСК листьев | | | | | | |
| 1. Контроль (9) | 4,99±2,00 | – | 100 | 11,7±1,7 | 18,8±5,2 | – |
| 2. ЦФ, 125 мг/кг×1 (10) | 4,77±0,26 | 4 | 90 | 4,7±0,9 p ₁₋₂ <0,01 | 2,3±1,0 p ₁₋₂ <0,01 | 64 |
| 3. ФСК листьев, 1 мл/кг×11 (10) | 5,26±0,26 | –5 | 100 | 8,1±0,9 p ₁₋₃ <0,05 | 7,1±1,5 p ₁₋₃ <0,05 | 31 |
| 4. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК листьев, 1 мл/кг×11 (10) | 4,14±0,20 p ₂₋₄ <0,05 | 17 | 20 p ₂₋₄ <0,01 | 0,3±0,2 p ₂₋₄ <0,01 | 0,02±0,01 p ₂₋₄ <0,01 | 99 |
| 5. ФСК листьев, 5 мл/кг×11 (10) | 4,59±0,25 | 8 | 90 | 6,1±1,4 p ₁₋₅ <0,05 | 4,3±1,2 p ₁₋₅ <0,01 | 53 |
| 6. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК листьев, 5 мл/кг×11 (10) | 4,60±0,18 | 8 | 10 p ₂₋₆ <0,01 | 0,1±0,1 p ₂₋₆ <0,01 | 0,01±0,01 p ₂₋₆ <0,01 | 99 |
| ФСК цветков | | | | | | |
| 1. Контроль (11) | 4,93±0,24 | – | 100 | 11,8±1,1 | 18,2±4,6 | – |
| 2. ЦФ, 125 мг/кг×1 (12) | 3,55±0,30 p ₁₋₂ <0,01 | 28 | 75 p ₁₋₂ <0,01 | 4,8±1,7 p ₁₋₂ <0,01 | 2,4±1,5 p ₁₋₂ <0,01 | 69 |
| 3. ФСК цветков, 1 мл/кг×12 (10) | 5,28±0,24 | –7 | 80 p ₁₋₃ <0,01 | 4,8±1,2 p ₁₋₃ <0,01 | 4,5±1,9 p ₁₋₃ <0,01 | 67 |
| 4. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК цветков, 1 мл/кг×12 (10) | 3,18±0,25 | 35 | 40 p ₂₋₄ <0,05 | 1,0±0,4 p ₂₋₄ <0,05 | 0,3±0,3 p ₂₋₄ <0,05 | 97 |
| 5. ФСК цветков, 5 мл/кг×12 (10) | 5,15±0,28 | –4 | 100 | 7,3±1,2 p ₁₋₅ <0,01 | 9,7±3,0 | 38 |
| 6. ЦФ, 125 мг/кг×1 + ФСК цветков, 5 мл/кг×12 (11) | 3,96±0,30 | 20 | 55 | 1,1±0,4 p ₂₋₆ <0,05 | 0,2±0,1 | 95 |

Выводы

Представленные данные фармакологических исследований влияния фенолсодержащих комплексов плодов, листьев и цветков *S. aucuparia L.* на развитие перевиваемых опухолей животных и эффективность ци-

тостатического лечения доказывают рациональность их использования в качестве новых источников лекарственного сырья с целью создания препаратов для дополнительной терапии злокачественных новообразований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н., Крылова С.Г., Гольдберг В.Е. *Растения в комплексной терапии опухолей*. М.: Изд-во РАМН, 2008:232. [Gol'dberg E.D., Razina T.G., Zueva E.P., Amosova E.N., Krylova S.G., Gol'dberg V.E. *Rasteniya v kompleksnoy terapii opukholey* [Plants in the complex therapy of tumors]. Moscow: Russian Academy of Medical Sciences Publ., 2008:232. (In Russian)].
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации: научное издание. М.: Минздрав России, 2018:1004. [Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiyskoy Federatsii: nauchnoe izdanie] [State Pharmacopoeia of the Russian Federation: scientific publication]. Moscow: Ministry of Health Care of Russia Publ., 2018:1004. (In Russian)].
3. Государственный реестр лекарственных средств: научное издание. М.: Минздрав России, 2020:1006. [Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv: nauchnoe izdanie] [State Register of medicines: scientific publication]. Moscow: Ministry of Health Care of Russia Publ., 2020:1006. (In Russian)].
4. Зверев Я.Ф. Противоопухолевая активность флавоноидов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;18(2):181–194. [Zverev Ya.F. *Protivopukhlevaya aktivnost' flavonoidov* [Antitumor activity of flavonoids]. *Bulleten' sibirskoy meditsiny* [Bulletin of Siberian Medicine]. 2019;18(2):181–194. (In Russian)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-181-194.
5. Зиновьева В.Н., Спасов А.А. Механизмы антиканцерогенных эффектов растительных полифенолов I. Блокирование инициации канцерогенеза. *Биомедицинская химия*. 2012;58(2):160–175. [Zinov'eva V.N., Spasov A.A. *Mekhanizmy antikantserogennykh effektov rastitel'nykh polifenolov. Blokirovaniye initsiatsii kantserogenezha* [Mechanisms of plant polyphenols anti-cancer effects I. Blockade of carcinogenesis initiation]. *Biomeditsinskaya Khimiya* [Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry]. 2012;58(2):160–175. (In Russian)]. DOI: 10.18097/pbmc20125802160.
6. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высшая школа, 1980;293. [Lakin G.F. *Biometrics*. Moscow: Vysshaya shkola Publ., 1980;293. (In Russian)].
7. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Скворцова В.В., Байтман Т.П., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. Противоопухолевая активность растительных экстрактов, содержащих биофлавоноиды. *Российский биотерапевтический журнал*. 2013;12(2):59. [Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Skvortsova V.V., Baytman T.P., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. *Protivopukhlevaya aktivnost' rastitel'nykh ekstraktov, soderzhashchikh bioflavonoidy* [Antitumor activity of plant extracts containing bioflavonoids]. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* [Russian Journal of Biotherapy]. 2013;12(2):59–59. (In Russian)].
8. Переводчикова Н.И. *Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний*. М.: Практическая медицина, 2005:704. [Perevodchikova N.I. *Rukovodstvo po himioterapii opukholevykh zabolevaniy* [Guidelines for the chemotherapy of neoplastic diseases]. Moscow: Prakticheskaya medicina Publ., 2005:704. (In Russian)].
9. *Растительные ресурсы России: дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. Семейства Actinidiaceae — Malvaceae, Euphorbiaceae — Haloragaceae*. СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009:243–245. [Rastitel'nye resursy Rossii: dikorastushchie cvetkovye rasteniya, ih komponentnyy sostav i biologicheskaya aktivnost'. T. 2. *Semejstva Actinidiaceae — Malvaceae, Euphorbiaceae — Haloragaceae* [Plant resources of Russia: wild flowering plants, their composition and biological activity. Vol. 2. Families Actinidiaceae — Malvaceae, Euphorbiaceae — Haloragaceae]. Saint Petersburg; Moscow: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ., 2009:243–245. (In Russian)].
10. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005:832. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. Pod red. R.U. Khabrieva. M.: Medicina, 2005:832. (In Russian)].
11. Самбукова Т.В., Овчинников Б.В., Ганопольский В.П., Ятманов А.Н., Шабанов П.Д. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2017;15(2):56–63. [Sambukova T.V., Ovchinnikov B.V., Ganapol'skiy V.P., Yatmanov A.N., Shabanov P.D. *Perspektivy ispol'zovaniya fitopreparatov v sovremennoy farmakologii* [Prospects for phytopreparations (botanicals) use in modern pharmacology]. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii* [Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy]. 2017;15(2):56–63. (In Russian)]. DOI: 10.17816/RCF15256-63.
12. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. *Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина*. Пушчино: Synchronbook, 2013:310. [Tarahovskiy Yu.S., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov E.N. *Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine*. Pushchino: Synchronbook Publ., 2013:310. (In Russian)].
13. Adams L.S., Phung S., Yee N., Seeram N.P., Li L., Chen S. Blueberry phytochemicals inhibit growth and

- metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Res.* 2010;70(9):3594–3605. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3565.
14. Adams L.S., Kanaya N., Phung S., Liu Z., Chen S. Whole blueberry powder modulate the growth and metastases of MDA-MB-231 triple negative breast tumors in nude mice. *J. Nutr.* 2011;141(10):1805–1812. DOI: 10.3945/jn.111.140178.
15. Bobinaitė R., Grootaert C., Van Camp J., Šarkinas A., Liaudanskas M., Žvikas V., Viškelis P., Rimantas Venskutonis P. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of the extracts isolated from the pomace of rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.). *Food Res. Int.* 2020;136:109310. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109310.
16. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 2002;13(10):572–584. DOI: 10.1016/s0955-2863(02)00208-5.
17. Huayi H.Y., Nong C.Z., Cuo L.X. The proliferation inhibition effect and apoptosis induction of Mangiferin on BEL-7404 human hepatocellular carcinoma cell. *Chinese J. Dig.* 2002;16(22):341–343.
18. Isaikina N.V., Kalinkina G.I., Razina T.G. Zueva E.P., Rybalkina O.Yu., Ulirich A.V., Fedorova E.P., Shilova A.B. *Sorbus aucuparia* L. fruit is a source of the drug for increasing the efficiency of tumor chemotherapy. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018;44(7):899–905. DOI: 10.1134/S1068162018070038
19. Iwashima T., Kudome Y., Kishimoto Y., Saita E., Tanaka M., Taguchi C., Hirakawa S., Mitani N., Kondo K., Iida K. Aronia berry extract inhibits TNF- α -induced vascular endothelial inflammation through the regulation of STAT3. *Food Nutr. Res.* 2019;63:175–186. DOI: 10.29219/fnr.v63.3361.
20. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2000;52(4):673–751.
21. Moon S.C., Choi H.J., Chung T.W., Lee J.H., Lee S.O., Jung M.H., Kim B.J., Choi J.Y., Ha K.T. *Sorbus commixta* water extract induces apoptotic cell death via a ROS-dependent pathway. *Oncol. Lett.* 2018;16(4):4193–4200. DOI: 10.3892/ol.2018.9217.
22. Sarv V., Venskutonis P.R., Bhat R. The *Sorbus* spp. – underutilised plants for foods and nutraceuticals: Review on polyphenolic phytochemicals and antioxidant potential. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(9):813. DOI: 10.3390/antiox9090813.
23. Soltys A., Galanty A., Podolak I. Ethnopharmacologically important but underestimated genus *Sorbus*: A comprehensive review. *Phytochem. Rev.* 2020;19:491–526. DOI: 10.1007/s11101-020-09674-9
24. Wang S.Y., Jiao H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48(11):5677–5684. DOI: 10.1021/jf000766i.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Рыбалкина Ольга Юрьевна*, к.б.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра» РАН; e-mail: olgomsk87@gmail.com

Разина Татьяна Георгиевна, д.б.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра» РАН; e-mail: razinatg22@gmail.com

Киселёва Елена Александровна, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра» РАН; e-mail: elena_kis@sibmail.com

Olga Yu. Rybalkina*, Cand. Sci. (Biol.), Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; e-mail: olgomsk87@gmail.com

Tatyana G. Razina, Dr. Sci. (Biol.), Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; e-mail: razinatg22@gmail.com

Elena A. Kiseleva, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; e-mail: elena_kis@sibmail.com

Калинкина Галина Ильинична, д.фарм.н., проф., ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;

e-mail: galina_kalinkina@mail.ru

Исайкина Надежда Валентиновна, к.фарм.н., доц., ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;

e-mail: nadezhda.isaykina@gmail.com

Зуева Елена Петровна, д.б.н., проф., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра» РАН;

e-mail: zep0929@mail.ru

Жданов Вадим Вадимович, д.м.н., проф., член-корр. РАН, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра» РАН;

e-mail: zhdanov_vv@pharmso.ru

Galina I. Kalinkina, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., Siberian State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: galina_kalinkina@mail.ru

Nadezhda V. Isaikina, Cand. Sci. (Pharm.), Assoc. Prof., Siberian State Medical University of the Ministry of Health Care of the Russian Federation;

e-mail: nadezhda.isaykina@gmail.com

Elena P. Zueva, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: zep0929@mail.ru

Vadim V. Zhdanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine of Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;

e-mail: zhdanov_vv@pharmso.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЭКСТРАКТА ТРАВЫ АСТРАГАЛА ЛИСЬЕГО

М.У. Сергалиева*, А.А. Цибизова, О.А. Башкина, М.А. Самотруева

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России
414000, Российская Федерация, Астрахань, ул. Бакинская, 121

Исследование посвящено изучению острой токсичности экстракта травы Астрагала лисьего (*Astragalus vulpinus Willd.*), произрастающего на территории Астраханской области. Эксперименты проводились на белых нелинейных крысах. Животные были разделены на несколько групп ($n=6$): контрольная, получавшая внутривентрикулярно воду дистиллированную, и опытные группы, получавшие однократно внутривентрикулярно экстракт травы Астрагала лисьего в дозах 100, 500, 1000, 2000 и 4000 мг/кг. В первые сутки после введения экстракта животные находились под непрерывным наблюдением. Во время наблюдения (в течение 14 сут) оценивали общее состояние животных, массу тела, отказ от пищи, состояние шерстного покрова, реакцию на звуковые, световые и тактильные раздражители. Реакция на звуковые раздражители оценивалась путём внезапного резкого стука по клетке, в результате чего обращали внимание на вздрагивание животного; реакция на световой раздражитель — путём освещения глаза фонариком и наблюдением за смыканием век; тактильные раздражители оценивали путём сжатия прикорневой части хвоста. После выведения животных из эксперимента проводили макроскопическое исследование внутренних органов (головной мозг, печень, селезёнка, сердце, желудок) и гематологический анализ мазков крови. В ходе исследования была установлена LD_{50} экстракта травы Астрагала лисьего. При введении экстракта в дозе 4000 мг/кг была зафиксирована смертность животных (к третьим суткам погибли 3 особи), у оставшихся животных наблюдалось снижение веса, количества лейкоцитов и изменение слизистой оболочки желудка. Оценка острой токсичности экстракта травы Астрагала лисьего показала, что данный экстракт относится к малотоксичным веществам, и его LD_{50} составляет 4000 мг/кг. Однако введение данного экстракта в дозе 4000 мг/кг привело к изменениям со стороны количества лейкоцитов и появлению изменений в слизистой оболочке желудка животных, что требует дополнительного проведения изучения хронической токсичности данного экстракта.

Ключевые слова: Астрагал лисий, экстракт, острая токсичность, белые крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Сергалиева М.У., Цибизова А.А., Башкина О.А., Самотруева М.А. Изучение острой токсичности экстракта травы Астрагала лисьего. *Биомедицина*. 2022;18(4):86–93. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-86-93>

Поступила 20.05.2022

Принята после доработки 10.09.2022

Опубликована 10.12.2022

STUDY OF ACUTE TOXICITY OF AN HERBAL EXTRACT OF *ASTRAGALUS VULPINUS*

Mariyam U. Sergalievа*, Aleksandra A. Tsibizova, Olga A. Bashkina,
Marina A. Samotrueva

*Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
414000, Russian Federation, Astrakhan, Bakinskaya Str., 121*

This paper studies the acute toxicity of an herbal extract of *Astragalus vulpinus* Willd. growing in the Astrakhan Oblast. Experiments were carried out on white nonlinear rats. The animals were divided into several groups (n = 6): the control group receiving intragastric distilled water and the experimental groups receiving intragastric extract of the *Astragalus vulpinus* extract once at doses of 100, 500, 1000, 2000, and 4000 mg/kg. On the first day after extract administration, the animals were under continuous observation. During the entire observation period for 14 days, the animals were monitored in terms of their general condition, body weight, food refusal, and coat appearance, as well as their response to sound, light, and tactile stimuli. The response to sound was evaluated by a sudden sharp knock on the cage and identification of the animal's flinching. The response to light was assessed by shining light into the eye with a penlight to control eye lid closure. Tactile stimuli were evaluated by compressing the basal part of the tail. After removing the animals from the experiment, macroscopic examination of internal organs (brain, liver, spleen, heart, stomach) and hematological analysis of blood smears were performed. During the research, the LD₅₀ of the *Astragalus vulpinus* herbal extract under study was established. When the extract was administered at a dose of 4000 mg/kg, animal mortality was recorded (3 individuals died by the third day). In the remaining animals, a decrease in weight and leukocyte count was observed along with changes in the gastric mucosa. In terms of acute toxicity, the extract under study was found to belong to low-toxic substances with an LD₅₀ of 4000 mg/kg. However, its administration at a dose of 4000 mg/kg led to changes in leukocyte count and gastric mucosa. Therefore, the chronic toxicity of *Astragalus vulpinus* herbal extracts requires additional research.

Keywords: *Astragalus vulpinus* Willd., extract, acute toxicity, white rats

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

For citation: Sergalievа M.U., Tsibizova A.A., Bashkina O.A., Samotrueva M.A. Study of Acute Toxicity of an Herbal Extract of *Astragalus Vulpinus*. *Journal Biomed.* 2022;18(4):86–93. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-86-93>

Submitted 20.05.2022

Revised 10.09.2022

Published 10.12.2022

Введение

Лекарственное сырьё природного происхождения, в т. ч. и растительного, широко применяется в медицинской и фармацевтической промышленности, что сопряжено с наличием ряда преимуществ, а именно хорошей переносимостью фитопрепаратов, возможностью длительного их применения, как правило, отсутствием серьёзных побочных эффектов, высокой биоактивностью, сравнимой с синтетическими средствами, и нетоксичностью в широком интервале доз. В связи с чем актуальными являются вопро-

сы поиска новых растительных источников лекарственных средств [1, 2]. В настоящее время идёт активное изучение биологических свойств растений рода Астрagal (*Astragalus*), семейства Бобовые (*Fabaceae*). Доказано, что растения данного рода обладают противовоспалительной, спазмолитической, гипотензивной, антиоксидантной и др. активностью [11]. Исследованиями последних лет установлен гипогликемический и гипохолестеринемический эффекты экстрактов растений рода Астрagal. Доказано наличие у извлечений корней

Astragalus membranaceus противомикробного и противовирусного действия, а также у *Astragalus glycyphyllos* — антипролиферативных и противоопухолевых эффектов [10, 14]. Экспериментальные исследования показали иммуностимулирующую активность экстрактов растений рода Астрагал, проявляющуюся способностью к восстановлению структуры повреждённого тимуса и ткани селезёнки и значительному усилению пролиферации лимфоцитов селезёнки, а также увеличению фагоцитоза перитонеальных макрофагов у мышей [12]. Кроме того, экстракт Астрагала повышает экспрессию IL-2, TNF- α и IFN- γ в периферической крови. Исследования показали, что представители рода Астрагал оказывают противоопухолевый эффект, механизм которого, вероятно, связан со стимуляцией иммунной системы, а также снижением активности теломеразы и индукцией апоптотических процессов опухолевых клеток. Показано, что экстракт Астрагала может регулировать сигнальную трансдукцию ядерного фактора-каппа В и секрецию провоспалительных и провоспалительных факторов, что в итоге уравнивает иммунный ответ [11]. Установлено, что применение экстракта Астрагала значительно улучшает когнитивные способности мышей, уменьшает апоптоз и накопление β -амилоида, что указывает на наличие нейропротекторного эффекта [9]. Многочисленные исследования подтверждают благотворное воздействие представителей рода Астрагал на нейродегенеративные, аутоиммунные и онкологические заболевания, диабет как 1-го, так и 2-го типа. Наряду с указанной фармакологической активностью многие виды Астрагала обладают токсичностью, которая обеспечивается в основном за счёт наличия в химическом составе алкалоидов и алифатических соединений [15].

Особый интерес представляет Астрагал лисий (*Astragalus vulpinus*), произрастающий на территории Астраханской обла-

сти. В предыдущих исследованиях был установлен химический состав данного растения и изучена его биологическая активность. Было доказано наличие в химическом составе большого количества сапонинов, флавоноидов, органических кислот в сравнении с другими представителями рода Астрагал [5]. Установлены антидепрессивный, стресспротекторный, иммуностимулирующий, антиоксидантный и противомикробный эффект травы Астрагала лисьего [3, 4]. Принимая во внимание описанное, можно сделать вывод, что растения травы Астрагала лисьего являются перспективным источником лекарственных средств, однако уровень безопасности и токсичности данного растения был изучен недостаточно.

В связи с чем **целью** данного исследования явилось изучение острой токсичности экстракта травы Астрагала лисьего, произрастающего на территории Астраханской области.

Материалы и методы

Объектом исследования являлся экстракт травы Астрагала лисьего, собранного в Приволжском районе Астраханской области в мае 2020 г. После первичной обработки сырья подвергали сушке в естественных условиях с соблюдением теневого режима. Высушенная трава была измельчена до размера частиц 5 мм. Экстракт Астрагала лисьего получали в соотношении 1:1 путём экстрагирования сырья 60%-ным этанолом на водяной бане в течение 2,5 ч с последующим удалением спирта на ротационном испарителе Hei-VAP Value G3 (Германия).

Эксперименты были проведены на белых нелинейных крысах в возрасте 3 мес. массой 190–210 г. Все исследования проводились с соблюдением Правил надлежащей лабораторной практики. При изучении острой токсичности животные были разделены на несколько групп ($n=6$): контрольная, получавшая внутривенно воду дистил-

лированную, и опытные группы, получавшие однократно внутривенно экстракт травы Астрагала лисьего (ЭА) в дозах 100, 500, 1000, 2000 и 4000 мг/кг. В первые сутки после введения экстракта животные находились под непрерывным наблюдением. Во время наблюдения (в течение 14 сут) оценивали общее состояние, массу тела, отказ от пищи, состояние шерстного покрова, реакцию на звуковые, световые и тактильные раздражители. Реакция на звуковые раздражители оценивалась путём внезапного резкого стука по клетке, в результате чего обращали внимание на вздрагивание животного; реакция на световой раздражитель — путём освещения глаза фонариком и наблюдением за смыканием век; тактильные раздражители оценивали путём сжатия прикорневой части хвоста.

После выведения животных из эксперимента проводили макроскопическое исследование внутренних органов (головной мозг, печень, селезёнка, сердце, желудок) и гематологический анализ (мазки крови, окрашенные по Романовскому—Гимзе).

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью BIOSTAT 2008 Professional 5.1.3.1. («Analyst-Soft Inc.», США). При обработке полученных результатов использовали параметрический метод с определением t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия в группах сравнения оценивали

при постоянно выбранном уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В первые и последующие сутки после введения ЭА в дозах от 100 до 1000 мг/кг не было отмечено изменений показателей в сравнении с контрольной группой животных; не было зафиксировано ни одной гибели. В группе крыс, получивших экстракт в дозах 2000 и 4000 мг/кг, через 2 ч после введения были отмечены следующие изменения: отказ от пищи и заторможенная реакция на звуковые, световые и тактильные раздражители. В группе, получившей 2000 мг/кг экстракта, все наблюдаемые изменения полностью нивелировались на третьи сутки, аппетит восстановился. В группе, получившей 4000 мг/кг экстракта, изменения сохранялись на протяжении 7-ми дней, аппетит оставался сниженным. При введении экстракта в дозе 4000 мг/кг была зафиксирована смертность животных — к третьим суткам погибли 3 особи, что составило 50% от численности группы.

Динамика изменения массы тела животных при однократном введении ЭА показана в табл. 1.

Анализ динамики массы тела показал, что в группах животных, которым вводили ЭА в дозах от 100 до 200 мг/кг, не было установлено статистически значимых из-

Таблица 1. Динамика изменения массы животных под влиянием экстракта травы Астрагала лисьего
Table 1. Changes in the animal weight under the influence of *Astragalus vulpinus* Willd extract

| Группы животных | Периоды наблюдений | | | |
|-----------------|--------------------|-------------|-------------|--------------|
| | 1 сут | 2 сут | 7 сут | 14 сут |
| Контроль | 197,23±12,4 | 200,05±11,3 | 210,00±12,4 | 218,86±10,7 |
| ЭА, 100 мг/кг | 198,37±9,6 | 199,48±8,6 | 201,68±7,9 | 206,40±9,6 |
| ЭА, 200 мг/кг | 197,96±10,6 | 199,68±13,8 | 202,65±10,7 | 209,34±11,7 |
| ЭА, 500 мг/кг | 200,50±13,7 | 203,46±12,4 | 207,68±8,4 | 213,50±10,5 |
| ЭА, 1000 мг/кг | 195,63±9,4 | 197,36±8,4 | 200,69±10,5 | 206,78±10,4 |
| ЭА, 2000 мг/кг | 197,64±10,5 | 192,36±8,2 | 196,40±10,6 | 201,91±11,8 |
| ЭА, 4000 мг/кг | 199,27±11,4 | 192,63±11,7 | 179,50±7,4* | 173,65±11,1* |

Примечание: *, ** — $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ — относительно контроля.

Note: *, ** — $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ — relative to the control.

менений в сравнении с контрольной группой животных; в группе крыс, получивших экстракт в дозе 4000 мг/кг, на 7-е сут масса тела уменьшилась на 15% ($p < 0,05$) и на 14-е сут — на 21% ($p < 0,05$) по отношению к контролю (табл. 1).

Результаты изменения гематологических показателей животных при однократном введении ЭА показаны в табл. 2.

Анализ гематологических изменений показал, что введение ЭА в указанных дозах не приводит к статистически значимым изменениям со стороны количества эритроцитов и тромбоцитов, уровня гемоглобина; введение в дозе 4000 мг/кг приводит к снижению количества лейкоцитов на 29% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных (табл. 2).

Принимая во внимание полученные результаты, можно отнести ЭА к 4-й группе токсичности (малотоксичные) и определить LD_{50} как 4000 мг/кг.

При проведении макроскопического анализа внутренних органов (головной мозг, печень, селезёнка, сердце, желудок) животных, получивших однократно ЭА в дозах от 100 до 2000 мг/кг, не было установлено статистически значимых отклонений в массе органов в сравнении с контролем. Однако введение экстракта в дозе 4000 мг/кг привело к появлению гиперемии и кровоизлияний в желудке.

Оценка острой токсичности ЭА показала, что данный экстракт относится к группе

малотоксичных веществ; смертность половины животных в группе, получавшей его в максимальной дозе, позволила определить LD_{50} как 4000 мг/кг. Данные результаты подтверждаются исследованиями других авторов, что освещено научными публикациями. Установлено отсутствие токсического воздействия *Astragalus campylosema* и *Astragalus hirsutus* на организм лабораторных животных [12]. Доказано отсутствие генетической токсичности и хронической токсичности у *Astragalus membranaceus* при 28-дневном пероральном введении экстракта крысам [14, 19]. В экспериментах показана нетоксичность экстракта *Astragalus onobrychis* [6, 16, 18]. Установлено, что пероральное применение *Astragalus hamosus* у крыс в разовой дозе 2000 мг/кг и в трёх различных дозах (75, 150 и 300 мг/кг) в течение 28-ми дней не вызывало смерти животных, но наблюдалось незначительное повышение мочевой кислоты, креатинина и общего холестерина; в максимальной дозе наблюдали снижение количества эритроцитов [8]. Введение водного экстракта *Astragalus membranaceus* в течение 3 мес. в дозах 1000, 3000 и 5000 мг/кг/день не привело к возникновению неблагоприятных изменений со стороны гематологических и биохимических показателей крови [15]. При сравнении используемых доз было установлено, что максимальный фармакологический эффект достигается при введении экстрактов различных видов рода Астрагал

Таблица 2. Изменения гематологических показателей под влиянием экстракта травы Астрала лисьего
Table 2. Changes in hematological parameters under the influence of *Astragalus vulpinus* Willd extract.

| Группы животных | Эритроциты, $\times 10^9$ | Гемоглобин, г/л | Лейкоциты, $\times 10^6$ | Тромбоциты, $\times 10^6$ |
|-----------------|---------------------------|-----------------|--------------------------|---------------------------|
| Контроль | 7,63 \pm 0,8 | 132 \pm 9,6 | 8,72 \pm 0,8 | 402,36 \pm 25,1 |
| ЭА, 100 мг/кг | 7,93 \pm 0,9 | 136 \pm 10,7 | 8,53 \pm 0,9 | 411,29 \pm 26,7 |
| ЭА, 200 мг/кг | 7,82 \pm 1,3 | 133 \pm 11,3 | 7,98 \pm 0,8 | 419,52 \pm 21,9 |
| ЭА, 500 мг/кг | 7,26 \pm 0,9 | 138 \pm 9,8 | 8,14 \pm 0,9 | 417,41 \pm 27,6 |
| ЭА, 1000 мг/кг | 8,09 \pm 1,0 | 132 \pm 10,4 | 8,65 \pm 0,7 | 409,98 \pm 30,4 |
| ЭА, 2000 мг/кг | 7,56 \pm 0,9 | 131 \pm 9,7 | 7,21 \pm 0,9 | 403,57 \pm 24,6 |
| ЭА, 4000 мг/кг | 6,39 \pm 0,8 | 127 \pm 10,6 | 6,23 \pm 0,8 | 387,66 \pm 21,4 |

Примечание: * — $p \leq 0,05$ — относительно контроля.

Note: * — $p \leq 0.05$ — relative to the control.

в диапазоне от 10 до 100 мг/кг, что обеспечивает широту терапевтического действия фитосредств на основе данного растения и подтверждает тот факт, что Астрагалы являются малотоксичными [13].

Введение ЭА в LD₅₀ (4000 мг/кг) привело к снижению массы тела крыс, количества лейкоцитов и изменению слизистой оболочки желудка, что делает необходимым исследование хронической токсичности. Гибель животных и изменения со стороны крови и желудка, вероятно, связаны с наличием в составе Астрагала лисьего большого количества сапонинов, что характерно для растений, произрастающих в условиях

повышенной солнечной инсоляции и низкой влажности [7].

Выводы

Оценка острой токсичности экстракта травы Астрагала лисьего (*Astragalus vulpinus* Willd.) показала, что данный экстракт относится к малотоксичным веществам, LD₅₀ составляет 4000 мг/кг. Однако введение данного экстракта в дозе 4000 мг/кг способствует снижению количества лейкоцитов и появлению изменений в слизистой оболочке желудка животных, что требует дополнительного изучения хронической токсичности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Брынцева И.А., Самотруева М.А., Цибизова А.А. Разработка средства для волос на основе «Тинакской» лечебной грязи Астраханской области. *Успехи современного естествознания*. 2014;5:190. [Bryntseva I.A., Samotrueva M.A., Tsibizova A.A. Razrabotka sredstva dlya volos na osnove «Tinakskoy» lechebnoy gryazi Astrakhanskoj oblasti [Development of a hair product based on the «Tinak» therapeutic mud of the Astrakhan region]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* [Successes of modern natural science]. 2014;5:190. (In Russian)].
2. Калашникова Е.А., Зайцева С.М., Киракосян Р.Н. Цитотоксичность и фунгицидная активность экстрактов, полученных из растений ашваганды и астрагала в условиях *in vitro*. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2019;2(42):57–63. [Kalashnikova E.A., Zaytseva S.M., Kirakosyan R.N. Tsitotoksichnost' i fungitsidnaya aktivnost' ekstraktov, poluchennykh iz rasteniy ashvagandy i astragala v usloviyakh in vitro [Cytotoxicity and fungicidal activity of extracts obtained from ashwagandha and astragalus plants under in vitro conditions]. *Aktual'nye voprosy veterinarnoy biologii* [Topical issues of veterinary biology]. 2019;2(42):57–63. (In Russian)]. DOI: 10.24411/2074-5036-2019-10027.
3. Сальникова Н.А., Шур Ю.В., Цибизова А.А., Коновалов Д.А. Скрининг антимикробной активности экстракта травы Астрагала лисьего (*Astragalus vulpinus* Willd.). *Астраханский медицинский журнал*. 2019;14(4):52–60. [Sal'nikova N.A., Shur Yu.V., Tsibizova A.A., Kononov D.A. Skriniring antimikrobnoy aktivnosti ekstrakta travy Astragala lis'ego (*Astragalus vulpinus* willd.) [Screening of antimicrobial activity of the extract of the herb *Astragalus vulpinus* (*Astragalus vulpinus* willd.)]. *Astrakhan Medical Journal*. 2019;14(4):52–60. (In Russian)].
4. Самотруева М.А., Мажитова М.В., Сергалиева М.У., Ясенявская А.Л. Фитохимическая характеристика травы *Astragalus vulpinus* willd. и психомодулирующая активность экстракта на его основе. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(2):40–45. [Samotrueva M.A., Mazhitova M.V., Sergaliev M.U., Yasenyavskaya A.L. Fitokhimicheskaya kharakteristika travy *Astragalus vulpinus* willd. i psikhomoduliruyushchaya aktivnost' ekstrakta na ego osnove [Phytochemical characteristics of the herb *Astragalus vulpinus* willd. and the psychomodulatory activity of the extract based on it]. *Chemical and Pharmaceutical Journal*. 2021;55(2):40–45. (In Russian)].
5. Сергалиева М.У., Барскова Н.А. Астрагал лисий (*Astragalus vulpinus* willd.) — источник биологически активных веществ. *Астраханский медицинский журнал*. 2017;12(1):56–63. [Sergaliev M.U., Barskova N.A. Astragal lisiy (*Astragalus vulpinus* willd.) — istochnik biologicheskii aktivnykh veshchestv [Astragalus vulpinus (*Astragalus vulpinus* willd.) — a source of biologically active substances]. *Astrakhan Medical Journal*. 2017;12(1):56–63. (In Russian)].
6. Темирбулатова А.М., Галкин М.А., Хромцова Е.Н., Погорелый В.Е., Лежнева Л.П., Шаталова Т.А. Изучение фармакологической активности экстракта астрагала эспарцетного. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;2–3:244. [Temirbulatova A.M., Galkin M.A., Khromtsova E.N., Pogorelyy V.E., Lezhneva L.P., Shatalova T.A. Izuchenie farmakologicheskoy aktivnosti ekstrakta astragala espartsetnogo [Study of the pharmacological activity of the extract of astragalus esparcet].

- Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education]. 2015;2–3:244. (In Russian)].
7. Фаттахова Г.А., Канарский А.В. Сапонины как биологически активные вещества растительно-го происхождения. *Вестник Казанского технологического университета*. 2014;17(3):196–202. [Fattakhova G.A., Kanarskiy A.V. Saponiny kak biologicheski aktivnyye veshchestva rastitel'nogo proiskhozhdeniya [Saponins as biologically active substances of plant origin]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of Kazan Technological University]. 2014;17(3):196–202. (In Russian)].
 8. Al-Snafi A.E. Chemical constituents and pharmacological effects of *Astragalus hamosus* and *Astragalus tribuloides* grown in Iraq. *Asian J. of Pharm. Sci. & Tech.* 2015;5(4):321–328.
 9. Guo L.Y., Shi F.L., Li M., Sun J.H., Li C.G., Liu Z.X. *Astragalus* protects PC12 cells from 6-hydroxydopamine-induced neuronal damage: A serum pharmacological study. *Chin. J. Physiol.* 2021;64(1):24–31. DOI: 10.4103/CJP.CJP_50_20.
 10. Khan H.M., Raza S.M., Anjum A.A., Ali M.A. Antiviral, embryo toxic and cytotoxic activities of *Astragalus membranaceus* root extracts. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2019;32(1):137–142.
 11. Kondeva-Burdina M., Shkondrov A., Simeonova R., Vitcheva V., Krasteva I., Ionkova I. In vitro/in vivo antioxidant and hepatoprotective potential of defatted extract and flavonoids isolated from *Astragalus spruneri* Boiss. (Fabaceae). *Food Chem. Toxicol.* 2018;111:631–640. DOI: 10.1016/j.fct.2017.12.020.
 12. Kurt-Celep I., Zengin G., Sinan K.I., Ak G., Elbasan F., Yildiztugay E., Maggi F., Caprioli G., Angeloni S., Sharmeen J.B., Mahomoodally M.F. Comprehensive evaluation of two *Astragalus* species (*A. campylosema* and *A. hirsutus*) based on biological, toxicological properties and chemical profiling. *Food Chem. Toxicol.* 2021;154:112330. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112330.
 13. Lysiuk R., Darmohray R. Pharmacology and ethnomedicine of the genus *Astragalus*. *Int. J. Pharmacol. Phytochem. Ethnomed.* 2016;3:46–53. DOI: 10.18052/www.scipress.com/IJPPE.3.46.
 14. Murbach T.S., Glávits R., Endres J.R., Hirka G., Vértesi A., Béres E., Szakonyiné I.P. Toxicological evaluation of a mixture of *Astragalus membranaceus* and *Panax notoginseng* Root Extracts (InnoSlim®). *J. Toxicol.* 2019;2019:5723851. DOI: 10.1155/2019/5723851.
 15. Park Y.C., Lee J.S., Kim D.Y., Son H.Y., Lee J.W., Cheoi Y.S., Lim J.D. A 90 day repeated dose-oral toxicity study of extracts from *Astragalus membranaceus* aboveground parts in rats. *Korean J. of Medicinal Crop Science.* 2013;21(6):474–485. DOI: 10.7783/kjmc.2013.21.6.474.
 16. Salehi B., Carneiro J.N.P., Rocha J.E., Coutinho H.D.M., Morais Braga M.F.B., Sharifi-Rad J., Semwal P., Painuli S., Moujir L.M., de Zarate Machado V., Janakiram S., Anil Kumar N.V., Martorell M., Cruz-Martins N., El Beyrouthy M., Sadaka C. *Astragalus* species: Insights on its chemical composition toward pharmacological applications. *Phytother. Res.* 2020. DOI: 10.1002/ptr.6974.
 17. Shen L., Gwak S.R., Cui Z.Y., Joo J.C., Park S.J. *Astragalus*-containing Chinese herbal medicine combined with chemotherapy for cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Front. Pharmacol.* 2021;12:587021. DOI: 10.3389/fphar.2021.587021.
 18. Zhang C.H., Yang X., Wei J.R., Chen N.M., Xu J.P., Bi Y.Q., Yang M., Gong X., Li Z.Y., Ren K., Han Q.H., Zhang L., Li X., Ji M.Y., Wang C.C., Li M.H. Ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, toxicology and clinical applications of *Radix Astragali*. *Chin. J. Integr. Med.* 2021;27(3):229–240. DOI: 10.1007/s11655-019-3032-8.
 19. Zhang J., Wu C., Gao L., Du G., Qin X. *Astragaloside IV* derived from *Astragalus membranaceus*: A research review on the pharmacological effects. *Adv. Pharmacol.* 2020;87:89–112. DOI: 10.1016/bs.apha.2019.08.002.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Сергалиева Мария Утежановна*, к.б.н., ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России; e-mail: charlina_astr@mail.ru

Цибизова Александра Александровна, к.фарм.н., ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России; e-mail: sasha3633@yandex.ru

Mariyam U. Sergalieva*, Cand. Sci. (Biol.), Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: charlina_astr@mail.ru

Aleksandra A. Tsibizova, Cand. Sci. (Pharm.), Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: sasha3633@yandex.ru

Башкина Ольга Александровна, д.м.н., проф.,
ФГБОУ ВО «Астраханский государственный
медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: bashkina1@mail.ru

Olga A. Bashkina, Dr. Sci. (Med.), Prof., Astrakhan
State Medical University of the Ministry of Health
Care of Russia;
e-mail: bashkina1@mail.ru

Самотруева Марина Александровна, д.м.н.,
проф., ФГБОУ ВО «Астраханский государст-
венный медицинский университет» Минздрава
России;
e-mail: ms1506@mail.ru

Marina A. Samotrueva, Dr. Sci. (Med.), Prof.,
Astrakhan State Medical University of the Ministry
of Health Care of Russia;
e-mail: ms1506@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКСОДЕНДРИТИЧЕСКИХ И АКСОСОМАТИЧЕСКИХ СИНАПСОВ В ОРБИТОФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ БЕЛЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС НА ФОНЕ МАЛОБЕЛКОВОЙ ПИЩИ ПОСЛЕ ОСТРОГО ЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

М.Э. Султанлы

*Научно-исследовательский институт физиологии им. акад. А. Караева
Национальной академии наук Азербайджана
AZ1100, Азербайджанская Республика, Баку, ул. Шариф-заде, 2*

Цель работы — изучить состояние аксодендритических (ADS) и аксосоматических (ASS) синапсов в I–IV слоях орбитофронтальной коры (ОФК) половозрелых белых лабораторных крыс в условиях сбалансированной и малобелковой пищи после острого звукового воздействия. Опыты выполнены на 64-х белых нелинейных половозрелых лабораторных крысах-самцах массой 180–230 г (8 — интактных, 56 — экспериментальных). После непрерывного звонка интенсивностью 120 дБ в течение 120 с 56 крыс разделены на 2 группы: с сбалансированной пищей (контрольная — 28) и малобелковой пищей (основная — 28); с двумя подгруппами, в каждой из них: стресс-устойчивые (по 12) и стресс-неустойчивые (по 16 животных). Прием воды — без ограничений. Животные из эксперимента выведены на 10-е, 20-е, 30-е и 40-е сут после звукового воздействия. Параллельно с гистологическими и иммуногистохимическими анализами образцы I–IV слоёв ОФК изучены также трансмиссионной электронной микроскопией. Электронно-микроскопические изменения строения ADS и ASS выявлены во всех слоях ОФК. Отмечены нарушения тонкой структуры как пресинаптического, так и постсинаптического полюсов. Максимальная выраженность ультраструктурных изменений при-суца ADS поверхностного (I, молекулярного), наружного зернистого (II), пирамидного (III) и внутреннего зернистого (IV) слоёв ОФК. Дезорганизация ASS отмечена преимущественно в контактах, постсинаптический полюс которых сформирован телами мелких пирамидных нейронов III слоя, а также пирамидных и звёздчатых нейронов IV слоя ОФК. Во всех сроках наблюдений нарушения тонкой организации наиболее выражены у стресс-неустойчивых животных основной группы опытов, особенно на 10-е и 20-е сут после воздействия. Острое звуковое воздействие инициирует нарушения тонкой организации аксодендритических и аксосоматических синапсов в I–IV слоях ОФК белых лабораторных крыс. Очаговая деструкция части отмеченных синапсов у крыс с малобелковой пищей после острого аудиогенного стресса имеет необратимый характер.

Ключевые слова: орбитофронтальная кора, мозг, электронная микроскопия, крыса, стресс, малобелковая пища

Для цитирования: Султанлы М.Э. Ультраструктурная характеристика аксодендритических и аксосоматических синапсов в орбитофронтальной коре белых лабораторных крыс на фоне малобелковой пищи после острого звукового воздействия. *Биомедицина*. 2022;18(4):94–101. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-94-101>

Поступила 25.02.2022

Принята после доработки 15.06.2022

Опубликована 10.12.2022

ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF AXODENDRITIC AND AXOSOMATIC SYNAPSES IN THE ORBITOFRONTAL CORTEX OF WHITE LABORATORY RATS ASSOCIATED WITH LOW-PROTEIN FOOD AFTER ACUTE SOUND EXPOSURE

Maya E. Sultanly

*Research Institute of Physiology named after Acad. A. Karaev
of the National Academy of Sciences of Azerbaijan
AZ1100, Republic of Azerbaijan, Baku, Sharif-zade Str., 2*

This paper investigates the state of axodendritic (ADS) and axosomatic (ASS) synapses in orbitofrontal cortex (OFC) layers I-IV of adult white laboratory rats associated with balanced and low-protein food after acute sound exposure. Experiments were performed on 64 white non-linear sexually mature laboratory male rats weighing 180–230 g (eight intact, 56 experimental). After a continuous call with an intensity of 120 db for 120 seconds, 56 rats were divided into two groups: those receiving balanced (control — 28) and low-protein food (basic — 28). Each of these two groups was divided into two subgroups: stress-resistant (12 animals in each) and stress-unstable animals (16 animals in each). Water intake was unlimited. The animals were removed from the experiment on the 10th, 20th, 30th, and 40th day after sound exposure. Along with histological and immunohistochemical analysis, the samples of OFC layers I–IV were studied by transmission electron microscopy. Electron microscopic changes in the structure of ADS and ASS were found in all OFC layers. Violations of the fine structure of both the presynaptic and postsynaptic poles were noted. The maximum severity of ultrastructural changes was observed in the ADS of the surface (I, molecular), outer granular (II), pyramidal (III), and inner granular (IV) OFC layers. ASS disorganization was noted mainly in contacts, the postsynaptic pole of which was formed by the bodies of small pyramidal neurons of layer III, as well as pyramidal and stellate neurons of layer IV of the OFC. During all periods of observation, violations of fine organization were most pronounced in stress-unstable animals of the main experimental group, especially on the 10th and 20th day after exposure. Acute sound exposure initiates disturbances in the fine organization of axodendritic and axosomatic synapses in OFC layers I–IV of white laboratory rats. Focal destruction of a part of the noted synapses in rats with a low-protein diet after acute auditory stress is irreversible.

Keywords: orbitofrontal cortex, brain, electron microscopy, rat, stress, low-protein food

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

For citation: Sultanly M.E. Ultrastructural Characteristics of Axodendritic and Axosomatic Synapses in the Orbitofrontal Cortex of White Laboratory Rats Associated with Low-Protein Food After Acute Sound Exposure. *Journal Biomed.* 2022;18(4):94–101. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-94-101>

Submitted 25.02.2022

Revised 15.06.2022

Published 10.12.2022

Введение

Орбитофронтальная кора (ОФК) — часть сложной интегративной функциональной системы, регулирующей также поведенческие реакции у различных млекопитающих. В настоящее время комплексно изучаются морфологические, нейрохимические и физиологические особенности ОФК в динамике адаптации центральной нервной системы к стрессу [4, 5, 6]. При этом

недостаточно освещены вопросы тонкой (ультраструктурной) организации различных морфологических типов межнейрональных контактов в условиях различных экстремальных воздействий, в частности — синаптических связей в I–IV слоях ОФК у белых лабораторных крыс — важнейших объектов при моделировании различных патологических состояний [3, 4, 8]. Не систематизированы ультраструктурные

нарушения двух основных морфологических типов синапсов — аксодендритических синапсов (axodendritic synapses, ADS) и аксосоматических синапсов (axosomatic synapses, ASS) — в ОФК, а также динамика их восстановления у крыс с малобелковым пищевым рационом после острого звукового воздействия.

Учитывая вышеизложенное, **целью** настоящего исследования явилось электронно-микроскопическое изучение аксодендритических и аксосоматических синапсов в I–IV слоях ОФК половозрелых белых лабораторных крыс в условиях сбалансированной и малобелковой пищи после острого звукового воздействия.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили 64 самца белых нелинейных половозрелых лабораторных крыс массой 180–230 г. Из них 8 животных содержались в условиях вивария с достаточной шумоизоляцией, адекватным освещением и вентиляцией, без ограничения приёма пищи и воды, выводились из опытов в аналогичном режиме с контрольной и основной группами (интактные животные; «норма»). Остальные 56 крыс в специальной камере-клетке были подвержены непрерывному звуковому воздействию звонком интенсивностью 120 дБ в течение 120 с. При подборе фактора-раз-

дражителя за основу были взяты данные о стрессогенности острого звука у крыс. Показателями неустойчивости к острому стрессорному звуковому воздействию послужили появление судорог у животных, избегание освещённых участков клетки, избегание центральных квадратов в клетке, резкое увеличение продолжительности неподвижности, уменьшение числа пищевых болсусов, уменьшение числа вертикальных стоек и вращательных движений головы, хаотичный и продолжительный груминг [1, 3]. По совокупности вышеперечисленных параметров подопытные животные после звукового воздействия были разделены на «стресс-устойчивые» (n=24) и «стресс-неустойчивые» (n=32). Далее были сформированы две группы опытов по 28 животных в каждой (12 — стресс-устойчивые; 16 — стресс-неустойчивые): контрольная (с сбалансированным пищевым рационом) и основная (с малобелковой пищей).

Животные контрольной группы с момента звукового воздействия до конца опытов (40-е сут) получали сбалансированную или богатую белками пищу по рецепту, предложенному в работе [11] (табл. 1).

Физиологическая потребность в белке у крыс составляет 5–15 г на 100 г массы животного, что обеспечивает нормальное развитие, рост и способность к размножению. [10]. Поскольку для нашего исследования основополагающим фактором являлось именно содержание белка, остальные ингредиенты рациона соответствовали физиологическим потребностям как в основной, так и в контрольной группах.

В основной группе опытов в пищевом рационе 80% белка казеина (16 г из 20 г на 100 г массы животного) было заменено крахмалом и растительной клетчаткой. Следовательно, животные основной группы с момента звукового воздействия до конца опытов — 40-е сут — содержались на бедной белками пище. Как и у животных

Таблица 1. Состав пищи у животных контрольной группы (из расчёта на 100 г массы животного)

Table 1. Food composition of animals in the control group (based on 100 g of animal weight)

| Ингредиенты | Количество |
|--------------------------|------------|
| Казеин, г | 20 |
| Крахмал, г | 65 |
| Растительное масло, мл | 5 |
| Клетчатка (целлюлоза), г | 5 |
| Комплекс витаминов, г | 1 |
| Пищевая соль (NaCl), г | 0,4 |

Примечание: приём воды — без ограничений (свободный доступ к резервуару воды).

Note: water intake is unlimited (free access to a water tank).

контрольной группы, ограничений в приёме воды не было.

Животные выводились из эксперимента внезапной массивной воздушной эмболизацией на 10-е, 20-е, 30-е и 40-е сут после звукового воздействия. Изменения фиксировались в каждой точке, однако сравнение проводилось в крайних точках наблюдения (10-е и 40-е сут). Сразу после умерщвления животных извлекались орбитофронтальные области обоих полушарий головного мозга. При уходе за животными и их умерщвлении были соблюдены принципы декларации Европейского сообщества о животных (86/609/ЕЕС), используемых в экспериментах, а также для других научных целей [7]. Руководствуясь атласами и стереотаксическими картами головного мозга белой лабораторной крысы [5, 13], в каждом случае были обозначены три зоны ОФК с обеих сторон: медиальная, вентральная и латеральная. Наряду с гистологическими и иммуногистохимическими анализами часть материала была взята на электронно-микроскопические исследования. Так, кусочки ОФК объёмом 1–2 мм³ были зафиксированы в смеси 2,5% глутарового альдегида, 2% параформальдегида, 4% глюкозы и 0,1% пикриновой кислоты на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) с последующей промывкой 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,4) и постфиксацией 1% четырёхокисью осмия (OsO₄) и 1,5% красной кровяной солью в течение 1,5 ч. В дальнейшем, после очередной промывки 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,4), кусочки были проведены через ряд спиртов 50–96°, ацетона и залиты в эпон-аральдитовую смесь. На основе предварительного (ориентировочного) изучения окрашенных 0,5% метиленовой синью + 0,1% фуксином полутонких срезов (0,5–1 мкм) соответствующих блоков были отобраны наиболее информативные участки, и из них на микротоме «Leica EM UC7» нарезаны ультратонкие срезы (50–60 нм). Последние были окрашены 2% уранил-

ацетатом и 0,6% цитратом свинца. Готовые контрастированные ультратонкие срезы были исследованы в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL) при напряжении катода 80,0 кВ. При выполнении электронно-микроскопических процедур обработки материала и интерпретации результатов анализа руководствовались общепринятыми научно-методическими изданиями [9, 12].

Интенсивность (выраженность) электронно-микроскопических изменений была оценена визуально-полуколичественно по 4-балльной шкале, отображённой в виде «–» (отсутствие изменения); «+» (до 25% изученных синапсов); «++» (26–50% изученных синапсов); «+++» (51–75% изученных синапсов); «++++» (более 75% изученных синапсов).

Для статистической обработки результатов исследования при нормальном распределении использовался t-критерий Стьюдента, при распределении, отличном от нормального, использовали U-критерий Вилкоксона при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Полученные нами изображения по ультратрунтурной организации ADS и ASS в ОФК у интактных белых лабораторных крыс в целом совпадают с результатами ранее проведённых работ [2, 8].

У подопытных животных электронно-микроскопические изменения строения ADS и ASS с той или иной частотой и степенью выраженности выявлены во всех слоях исследованных зон ОФК. Отмечены нарушения тонкой структуры составных частей как пресинаптического, так и постсинаптического полюсов обоих типов синапсов. В синапсах аксондритического типа максимальная выраженность ультратрунтурных изменений присуща синапсам в поверхностном (I, молекулярном), наружном зернистом (II), пирамидном (III) и внутреннем зернистом (IV) слоях во всех изученных

зонах ОФК. Дезорганизация ASS же отмечена преимущественно в контактах, постсинаптический полюс которых сформирован телами мелких пирамидных нейронов III слоя, а также пирамидных и звёздчатых нейронов IV слоя ОФК. Обнаруженные изменения синапсов касаются как электронной плотности матрикса аксоплазмы, дендроплазмы, перикариона, так и тонкого строения их субструктур.

Различные проявления нарушений электронно-микроскопической организации ADS и ASS частично отражены в сводной таблице (табл. 2).

Как видно из табл. 2, наиболее выраженные ультраструктурные изменения обоих

типов синапсов отмечены у животных, содержащихся на малобелковом пищевом рационе после звукового воздействия. Так, у стресс-неустойчивых животных основной группы опытов выявлены сложные сочетания просветления (набухания) и уплотнения матрикса, очаговой деструкции и «тёмной» дегенерации структур пре- и постсинаптического полюсов, а также размеров, форм, электронной плотности и количества (плотности распределения) синаптических везикул в динамике эксперимента. У животных данной подгруппы, начиная с 20-х сут наблюдений, обнаружены относительно многочисленные аморфные и кристаллоидные осмиофильные отложения размерами

Таблица 2. Динамика основных электронно-микроскопических нарушений тонкого строения аксодендритических (ADS) и аксосоматических (ASS) синапсов в орбитофронтальной коре головного мозга у белых лабораторных крыс после острого звукового воздействия

Table 2. Dynamics of the main electron-microscopic disturbances in the fine structure of axodendritic (ADS) and axosomatic (ASS) synapses in the orbitofrontal cortex of the brain in white laboratory rats after acute sound exposure

| Показатель | Группа | | | | | | | |
|---|---|----|---------------------|----|--|----|---------------------|-----|
| | Контрольная группа (сбалансированная пища) | | | | Основная группа (малобелковая пища) | | | |
| | Стресс-устойчивые | | Стресс-неустойчивые | | Стресс-устойчивые | | Стресс-неустойчивые | |
| | I | II | I | II | I | II | I | II |
| Набухание пресинаптического конца (терминаля) аксона | + | - | ++ | - | ++ | + | +++ | ++ |
| Отёк и просветление матрикса пре- и постсинаптических полюсов | + | - | ++ | + | ++ | + | +++ | ++ |
| Агглютинация, перераспределение и частичная деструкция синаптических везикул | ++ | - | ++ | + | ++++ | ++ | ++++ | +++ |
| Отёк, просветление матрикса и частичная фрагментация крипт митохондрий | ++ | - | ++ | - | +++ | + | ++++ | ++ |
| Сморщивание и уплотнение матрикса митохондрий | + | - | ++ | + | +++ | + | +++ | ++ |
| Накопление электронно-плотных остаточных микротелец | - | - | - | + | + | ++ | + | +++ |
| Частичная или точечная фрагментация пресинаптической мембраны | - | - | + | - | ++ | + | +++ | ++ |
| Частичная или точечная фрагментация постсинаптической мембраны | - | - | + | + | ++ | + | +++ | +++ |
| Деформация и редукция синаптической щели | - | - | + | - | ++ | - | ++ | + |
| Расширение синаптической щели с отложениями аморфного электронно-плотного субстрата в ней | - | - | + | + | + | + | + | + |

Примечание: I — 10-е сут после острого звукового воздействия; II — 40-е сут после острого звукового воздействия.

Note: I — 10th day after acute sound exposure; II — 40th day after acute sound exposure.

40–380 нм. Возможно, указанные отложения представляют собой скопления остаточных телец после аутофагосомии в пре- и постсинаптических структурах, особенно в подмембранной полосе перикариона ASS пирамидных нейронов III слоя ОФК у животных, содержащихся на малобелковой пище после острого звукового воздействия. Вместе с тем данное предположение нуждается в дальнейшем подкреплении в комплексных исследованиях.

Некоторые признаки — как по качественным параметрам, так и по частоте выявления — достоверно чаще обнаруживались среди животных в основной группе, чем в контрольной. К таким признакам относились агглютинация, перераспределение и частичная деструкция синаптических везикул (75% в основной группе против 57,1% в контрольной, $p < 0,05$); отёк, просветление матрикса и частичная фрагментация крипт митохондрий (71,4 и 46,4% соответственно, $p < 0,01$); частичная или точечная фрагментация пресинаптической мембраны (67,9 и 39,3% соответственно, $p < 0,01$).

Достоверная межгрупповая разница в частоте выявления имела место и среди некоторых структурных параметров у стресс-устойчивых и стресс-неустойчивых животных, находящихся на малобелковом рационе. Так, набухание пресинаптического конца (терминаля) аксона встречалось у 33,3% стресс-устойчивых и 56,3% стресс-неустойчивых животных ($p < 0,05$), а такие изменения, как отёк и просветление матрикса пре- и постсинаптических полюсов — у 41,7 и 75% соответственно ($p < 0,01$).

В целом, к 40-м сут эксперимента, при частичном восстановлении электронной плотности, продолжают оставаться фокусы уплотнения («тёмной» дегенерации) синапсов, особенно на телах (постсинапти-

ческих полюсах) звёздчатых и пирамидных нейронов II–IV слоёв ОФК.

Установлено, что некоторые электронно-микроскопические нарушения строения ASS и ADS в ОФК у стресс-неустойчивых животных основной группы остаются даже спустя 40 сут от начала эксперимента и, скорее всего, приобретают необратимый характер. Функциональные проявления же выявленных остаточных ультроструктурных изменений части ADS и ASS I–IV слоёв различных зон ОФК нуждаются в дополнительном комплексном нейрофизиологическом и морфологическом исследовании.

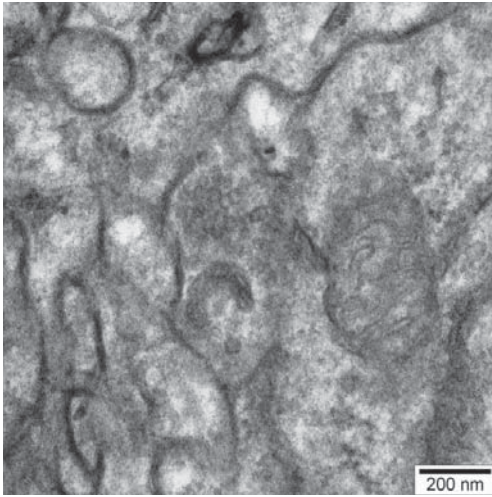
Электронно-микроскопическая организация аксодендритических и аксосоматических синапсов в различных слоях ОФК у крыс с малобелковым пищевым рационом после острого звукового воздействия частично представлена на рисунке.

Выводы

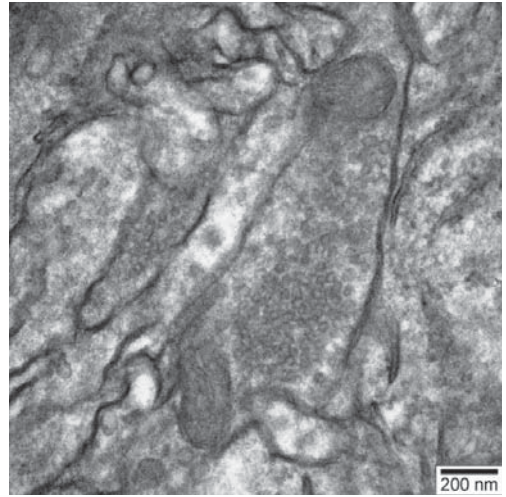
Острое звуковое воздействие инициирует нарушения тонкой организации аксодендритических и аксосоматических синапсов в I–IV слоях различных зон орбитофронтальной коры белых лабораторных крыс.

Очаговая деструкция тонкой организации отдельных аксодендритических и аксосоматических синапсов у крыс с малобелковой пищей после острого аудиогенного стресса имеет необратимый характер и может рассматриваться как проявление нарушений межнейронных связей в орбитофронтальной коре у животных в условиях малобелковой пищи.

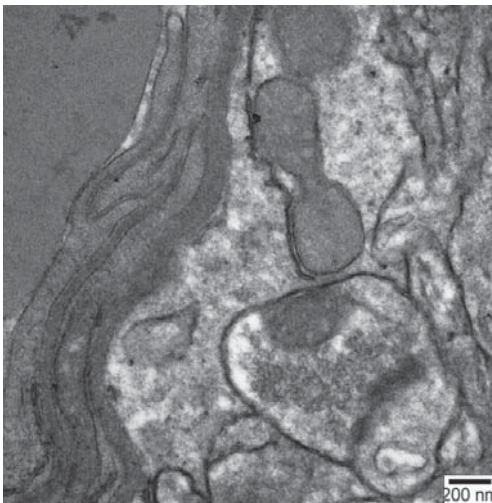
Полученные в ходе работы результаты могут быть использованы для прогнозирования нарушений межнейронных контактов в условиях звукового стресса, а также для разработки средств фармакологической коррекции острого или хронического звукового стресса.



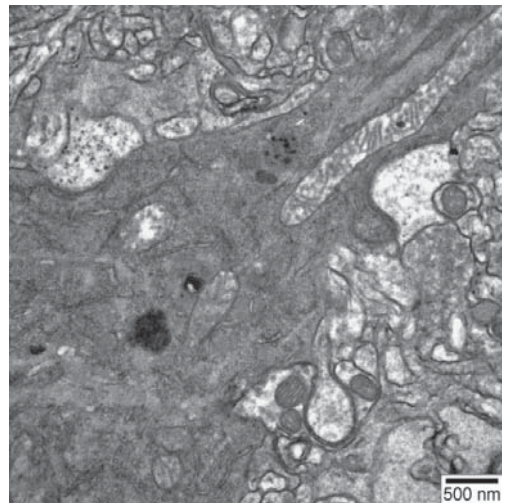
A



Б



B



Г

Рис. Электронно-микроскопические особенности синапсов в ОФК у стресс-неустойчивых белых лабораторных крыс на фоне малобелковой пищи после острого звукового воздействия. Набухание (просветление) матрикса, полиморфизм и частичное разрушение синаптических везикул в аксондритических синапсах в I слое вентральной зоны ОФК (А, Б); деформация и уплотнение митохондрий, аномальное сосредоточение синаптических везикул в центре пресинаптического полюса, аномально зернистый матрикс в аксондритическом синапсе в I слое медиальной зоны ОФК (В); мозаичные поля просветления и уплотнения аксондритических и аксосоматических синапсов, осмиофильные включения на фоне уплотнения и тёмной дегенерации тела нейрона в I слое вентральной зоны ОФК. А — 10-е сут, Б — 20-е сут, В — 30 сут, Г — 40 сут эксперимента. Увеличение: см. масштабы на рисунках.

Fig. Electron microscopic features of synapses in OFC in stress-unstable white laboratory rats associated with low-protein food after acute sound exposure. Swelling (clearance) of the matrix, polymorphism, and partial destruction of synaptic vesicles in axodendritic synapses in layer I of the ventral zone of the OFC (A, B); deformation and compaction of mitochondria, abnormal concentration of synaptic vesicles in the center of the presynaptic pole, abnormally granular matrix in the axodendritic synapse in layer I of the medial OFC zone (B); mosaic fields of clarification and compaction of axo-dendritic and axo-somatic synapses, osmiophilic inclusions against the background of thickening and dark degeneration of the neuron body in layer I of the ventral zone of OFC. A — day 10; Б — day 20; В — day 30; Г — day 40 of the experiment. Magnification is shown on the pictures.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Кузнецова Г.Д. Аудиогенные судороги у крыс разных генетических линий. *Журнал ВНД*. 1998;48(1):143–152. [Kuznetsova G.D. Audiogennyye sudorogi u krysv raznykh geneticheskikh liniy [Audiogenic seizures in rats of different genetic lines]. *Zhurnal VND [Journal of Higher Nervous Activity]*. 1998;48(1):143–152. (In Russian)].
2. Никитина Е.А. Функциональные ансамбли в мозге человека и животных. *Физиология человека*. 2021;47(5):118–127. [Nikitina E.A. Funktsional'nye ansambl'i v mozge cheloveka i zhivotnykh [Functional ensembles in the brain of humans and animals]. *Fiziologiya cheloveka [Human physiology]*. 2021;47(5):118–127. (In Russian)]. DOI: 10.31857/S0131164621050039.
3. Поletaева И.И., Зорина З.А. *Формирование поведения животных в норме и патологии. К 100-летию со дня рождения Л.В. Крушинского*. М.: Языки славянских культур, РФФИ, 2013:489. [Poletaeva I.I., Zorina Z.A. *Formirovaniye povedeniya zhivotnykh v norme i patologii. K 100-letiyu so dnya rozhdeniya L.V. Krushinskogo [Formation of animal behavior in normal and pathological conditions. To the 100th anniversary of the birth of L.V. Krushinsky]*. Moscow: Yazyki slavyanskikh kul'tur, RFFI Publ., 2013:489. (In Russian)].
4. Dalley J.W., Cardinal R.N., Robbins T.W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2004;28(7):771–784. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2004.09.006.
5. Fuster J.M. *The prefrontal cortex. Fourth Ed.* London, Burlington, San Diego: Academic Press, 2008:410.
6. *Guidelines for accommodation and care of animals (article 5 of the convention) approved by the multilateral consultation*. Strasbourg, 2006, cons. 123.
7. Harris K.M., Weinberg R.J. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012;4(5):a005587. DOI: 0.1101/cshperspect.a005587.
8. Holmgren C., Harkany T., Svennenfors B., Zilberter Y. Pyramidal cell communication within local networks in layer 2/3 of rat neocortex. *J. Physiol.* 2003;551(1):139–153. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.044784.
9. Kuo J. *Electron microscopy: methods and protocols*. Tokyo: Humana Press, 2007:625.
10. *National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Ed.* Washington, DC: National Academies Press, 1995. DOI: 10.17226/4758.
11. Nikinorov M., Urbanek-Karlowska B., Karlowska K. Protein deficient diets. Activity of selected enzymes of protein and carbohydrate metabolism. *Toxicology*. 1973;1(4):263–276. DOI: 10.1016/0300-483x(73)90033-4.
12. *Springer Handbook of Microscopy*. Ed. by P. Hawkes, J.C.H. Spence. Springer Nature Switzerland AG, 2019:1543.
13. Watson C., Paxinos G. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London, San Diego: Academic Press, 2007:456.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ | INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Султанлы Мая Эльхан гызы, Научно-исследовательский институт физиологии им. акад. А. Караева Национальной академии наук Азербайджана;
e-mail: msultanli80@gmail.com

Maya E. Sultanly, Research Institute of Physiology named after Acad. A. Karaev of the National Academy of Sciences of Azerbaijan;
e-mail: msultanli80@gmail.com



ОСОБЕННОСТИ ГИСТОСТРУКТУРЫ КРЕСТЦОВО-КАУДАЛЬНОЙ (КОПЧИКОВОЙ) ДОРСАЛЬНОЙ ЛАТЕРАЛЬНОЙ МЫШЦЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЗАДНЕГО АРТРОДЕЗА КРЕСТЦОВО-ПОДВЗДОШНОГО СУСТАВА

Г.Н. Филимонова*, О.В. Дюрягина, Н.И. Антонов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. академика Г.А. Илизарова» Минздрава России
640014, Российская Федерация, Курган, ул. М. Ульяновой, 6

Паравerteбральные мышцы играют не последнюю роль в развитии деформаций и дегенеративных заболеваний позвоночника. В эксперименте на животных исследовали влияние техники заднего артродеза илиосакрального сочленения (крестцово-подвздошного сустава, КПС) на морфологические характеристики крестцово-каудальной (копчиковой) дорсальной латеральной мышцы. Использовали титановые кейджи с последующей стабилизацией аппаратом внешней фиксации в течение 30 сут. Преимуществами заднего артродеза являются небольшой разрез, минимальная кровопотеря, сохранение целостности большинства связок, короткий период иммобилизации. Тем не менее, при экспериментальном моделировании на животных артродеза КПС в прилежащей мышце выявлены фиброзирование интерстициального пространства и жировая инфильтрация, составившие от интактных параметров 240% и 310% соответственно, по окончании эксперимента, фиброз оболочек сосудов артериального звена. Необходимо нивелировать травматизацию мышц при оперативных вмешательствах на позвоночнике с целью минимизировать процессы фиброгенеза и жировой инволюции паравerteбральных мышц.

Ключевые слова: артродез крестцово-подвздошного сочленения, эксперимент, крестцово-каудальная (копчиковая) дорсальная латеральная мышца, морфология

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания «Разработка и оценка эффективности применения пациентоориентированных имплантов в хирургии осевого скелета» (рег. № АААА-А18-11801190118-8).

Для цитирования: Филимонова Г.Н., Дюрягина О.В., Антонов Н.И. Особенности гистоструктуры крестцово-каудальной (копчиковой) дорсальной латеральной мышцы при моделировании заднего артродеза крестцово-подвздошного сустава. *Биомедицина*. 2022;18(4):102–111. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-102-111>

Поступила 01.04.2022

Принята после доработки 18.11.2022

Опубликована 10.12.2022

HYSTOSTRUCTURE FEATURES OF THE SACRA-CAUDAL (COCCYGEAL) DORSAL LATERAL MUSCLE WHEN MODELING POSTERIOR ARTHRODESIS OF THE ILEOSACRAL JOINT

Galina N. Filimonova*, Olga V. Diuriagina, Nikolai I. Antonov

National Ilizarov Medical Research Centre for Traumatology and Orthopaedics
of the Ministry of Health Care of Russia
640014, Russian Federation, Kurgan, M. Ulianovoj Str., 6

Paravertebral muscles play an important role in the development of deformities and degenerative diseases of the spine. The impact of posterior arthrodesis of the ileosacral articulation (sacrum-iliac joint) on the morphological characteristics of the *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* of mongrel dogs was studied in animal experiments. Titanium cages were used, followed by stabilization with an external fixation device for 30 days. The advantages of posterior arthrodesis include a small incision, minimal blood loss, preservation of the integrity of most ligaments, and a short immobilization period. Nevertheless, when modeling arthrodesis experimentally in animals, fibrosis of the interstitial space and fatty infiltration in the adjacent muscle were revealed at the end of the experiment, which amounted to 240% and 310% of the intact parameters, respectively. In addition, fibrosis of the vessel membranes of the arterial link was observed. When performing surgical interventions on the spine, traumatization of the muscles should be reduced in order to minimize fibrogenesis and fatty involution of the paravertebral muscles.

Keywords: posterior arthrodesis of the ileosacral articulation, experiment, sacra-caudal (coccygeal) dorsal lateral muscle, morphology

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

Funding: the work was carried out within the framework of the State assignment “Development and evaluation of the effectiveness of the use of patient-oriented implants in axial skeleton surgery” (reg. No. AA-AA-A18-11801190118-8).

For citation: Filimonova G.N., Diuriagina O.V., Antonov N.I. Hystostructure Features of the Sacra-Caudal (Coccygeal) Dorsal Lateral Muscle when Modeling Posterior Arthrodesis of the Ileosacral Joint. *Journal Biomed.* 2022;18(4):102–111. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-102-111>

Submitted 01.04.2022

Revised 18.11.2022

Published 10.12.2022

Введение

Боль в пояснице широко распространена у людей как в развитых, так и в развивающихся странах и является основной причиной многолетней инвалидности [9]. Частой причиной болей в нижнем отделе позвоночника является патология крестцово-подвздошного сустава (КПС, илиосакральное сочленение). У 70% пациентов дегенеративно-дистрофические заболевания позвоночника связаны с патологией данного сустава, от 15 до 30% из них страдают хронической болью [11, 16]. КПС — это парный тугоподвижный сустав, выполняющий опорную функцию,

образованный ушковидными поверхностями крестца и подвздошной кости. КПС входит в состав «крестцово-подвздошного комплекса», который включает собственно сустав, поддерживающие связки, части некоторых региональных мышц и нервы, иннервирующие эти структуры, и каждый из этих элементов может стать источником боли [16].

Для лечения патологии илиосакрального сочленения используют как консервативные методы, так и хирургические, в частности, артродез, при котором сустав закрепляется в фиксированном положении. Впервые замыкание сустава осуществил венский

хирург Е. Albert в 1878 г. Хирургическая фиксация может осуществляться с помощью бокового, заднего и заднебокового доступов [11].

Установлена безопасность и эффективность техники артродеза КПС с титановыми имплантатами для лечения дегенеративного сакроилеита, разрыва сустава [19]. Анатомически задний доступ выполняется чрескожно и позволяет избежать повреждения сосудисто-нервных структур, которые встречаются при трансподвздошном доступе [22]. Всё чаще для артродеза КПС применяются треугольные титановые имплантаты, что приводит к немедленному, стойкому снижению боли и улучшению качества жизни [18].

В связи с появлением малоинвазивных хирургических методов произошёл прорыв в производстве новых устройств, используемых для артродезирования КПС [13, 17]. Особенно хорошо зарекомендовало себя применение минимально инвазивного артродеза с использованием iFuse Implant System [10, 20]. Проанализированы ключевые моменты формирования межтелового блока после декомпрессивно-стабилизирующих операций на пояснично-крестцовом отделе позвоночника [1]. При оперативном лечении посттравматической деформации таза применяют транспедикулярную спинальную систему и блок-решётку [5]. В литературе по биомеханике обсуждаются вопросы, требующие дальнейшего изучения, особенно в отношении устройств, используемых в минимально инвазивной хирургии КПС [14]. Биомеханические исследования решили некоторые из таких вопросов, как конструкция и оптимальное число имплантатов, их расположение с учётом различной плотности костной ткани в КПС, одностороннее или двустороннее их размещение.

Итак, оперативный доступ, способ стабилизации, выбор имплантатов при артродезе крестцово-подвздошного сочленения яв-

ляются предметом обсуждений. При этом мало внимания уделено состоянию близлежащих к КПС мышц, которые играют не последнюю роль в развитии деформаций и дегенеративных заболеваний позвоночника [7, 12].

Цель работы — исследовать влияние техники заднего артродеза крестцово-подвздошного сустава на гистоструктурные особенности крестцово-каудальной (копчиковой) дорсальной латеральной мышцы.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 14-ти беспородных собаках обоего пола в возрасте 2–3 лет массой 13±4 кг; для контроля исследованы интактные особи (n=3). Подопытным животным выполняли задний артродез правого крестцово-подвздошного сустава с использованием титановых кейджей с последующей стабилизацией аппаратом внешней фиксации в течение 30 сут. Эвтаназию осуществляли через 6 (n=5), 12 (n=6) и 18 мес. (n=3). Исследовали *m. sacrocaudalis dorsalis lateralis* справа от позвоночника.

Работа была одобрена этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России. Животные содержались в стандартных условиях вивария, в вольерах размером 1,5×1,5 м. Манипуляции проводились в соответствии с требованиями межгосударственных стандартов и санитарно-эпидемиологических требований Российской Федерации [3, 4, 6]. Премедикацию осуществляли р-рами димедрола 1% (0,02 мг/кг), атропина сульфата 0,1% (0,02 мг/кг), дроперидола 1% (0,5 мг/кг) и рометара 2% (1 мг/кг). Эвтаназию выполняли после премедикации р-ром димедрола 1% (0,02 мг/кг) и рометара 2% (1 мг/кг) с последующим введением летальной дозы барбитуратов.

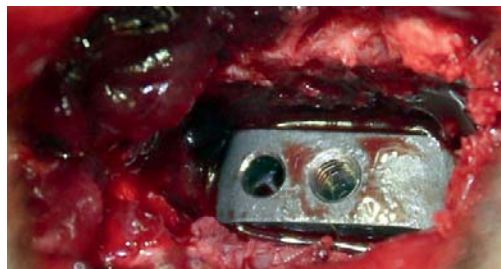
Модель эксперимента. Собаку укладывали на живот, на уровне L_{VII} и S_{I-II} паравертебрально выполняли линейный разрез кожи, подкожной клетчатки и ягодичной фасции длиной 5 см. Для доступа к крестцово-подвздошному сочленению крестцово-хвостовую дорсальную латеральную мышцу смещали медиально на 1,5–2 см и удерживали зубчатым крючком Фолькмана в течение времени, необходимого для установки кейджа (25–30 мин). Затем удаляли прямоугольный лоскут дорсальной связки до губчатого слоя крыла подвздошной кости и крестца. Далее долотом формировали ложе, соответствующее размеру имплантата, путём выборки суставных поверхностей КПС с захватом прилегающей губчатой костной ткани крыла подвздошной кости и крестца. Имплантат вводили с помощью рукоятки-проводника посредством вколачивания, кровопотеря была минимальной. Неврологических осложнений и гематом в послеоперационный период не наблюдали. После установки имплантата рану послойно ушивали узловыми швами Викрилом 4/0. КПС стабилизировали аппаратом внешней фиксации в течение 30 сут (рис. 1А, Б).

После эвтаназии животных фрагменты мышцы иссекали в проекции внедрения кейджа и фиксировали в смеси равных

объёмов 2%-ного глутарового и 2%-ного параформальдегида, заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином-эозином, по Ван-Гизону, трихромным методом по Массону. Изучали с помощью стереомикроскопа «AxioScope.A1» и встроенной цифровой фотокамеры «AxioCam» («Carl Zeiss MicroImaging GmbH», Германия). Посредством стереологического анализа определяли: объёмную плотность ($\text{мм}^3/\text{мм}^3$) мышечных волокон (VV_{mf}), микрососудов (VV_{mv}), эндомизия (VV_{end}), ядерного компонента мышечной ткани (VV_n); численную плотность (мм^{-2}) миосимпластов и микрососудов (NA_{mf} ; NA_{mv}). Рассчитывали параметр, оценивающий васкуляризацию мышцы и, косвенно, её оксигенацию, NA_{mv}/NA_{mf} — индекс васкуляризации, видовой константа. Достоверность отличий оценивали на основании непараметрического критерия Вилкоксона для независимых выборок, различия считали значимыми при $p < 0,05$, обработку цифровых данных проводили в программе AtteStat версия 10.8.8, встроенной в Microsoft Excel [2].

Результаты исследований

В контрольной группе гистоструктура крестцово-каудальной (копчиковой) дорсальной латеральной мышцы характеризовалась полигональными единообразными



А



Б

Рис. 1. Установка титанового кейджа между крестцом и крыльями подвздошных костей поясничных позвонков собаки: А — отведение *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis*; Б — положение кейджей в крестцово-подвздошных суставах в прямой проекции на рентгенограмме.

Fig. 1. Mounting a titanium cage between the sacrum and the iliac wings of canine lumbar vertebrae: А – abduction of *m. sacrocaudalis dorsalis lateralis*; Б – position of the cages in the sacroiliac joints in X-ray direct projection.

профилями мышечных волокон, минимумом эндомизия, сосуды в перимизии без фиброза оболочек (рис. 2А, Б). Встречались мышечные волокна с признаками обратимых контрактур, нервно-мышечные веретена и внутримышечные нервные проводники имели нормальное строение (рис. 2В).

Через 6 мес. в *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* наблюдались признаки структурной реорганизации: повышалась вариабельность диаметров миосимпластов, фиброз эндо- и перимизия, адипоциты в пучках мышечных волокон, обширные поля жировой дегенерации (рис. 3А).

Некоторые перимизиальные сосуды имели признаки адвентициального фиброза, были спазмированы, погружены в обширные конгломераты адипоцитов (рис. 3Б, В).

Через 12 мес. эксперимента гистоструктура крестцово-каудальной (копчиковой) дорсальной латеральной мышцы сохраняла перечисленные выше признаки структурной адаптации. Были характерны внутренние ядра в волокнах (рис. 4А), увеличенный перимизий заполнялся множественными жировыми клетками (рис. 4Б). Наблюдались гипертрофированные миосимпласты, погруженные в соединительнотканые разра-

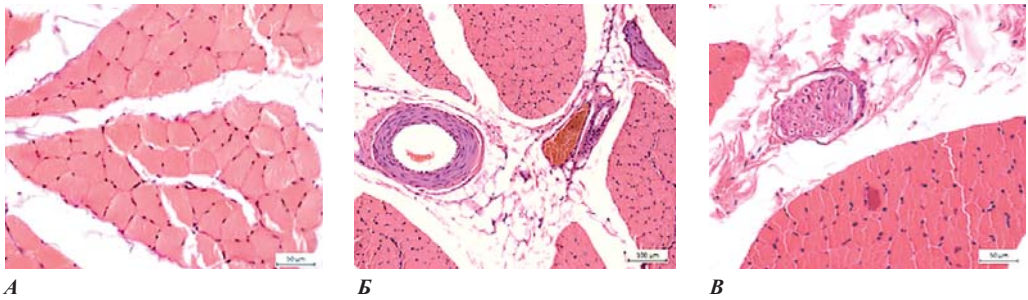


Рис. 2. Гистоструктура *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* в контроле: А — полигональные профили волокон, минимум эндомизия; Б — перимизиальные сосуды с нормоструктурой; В — нервный ствол без патологии. Фрагменты парафиновых срезов, окраска гематоксилином-эозином, увеличение: ×400 (А, В), ×200 (В).
Fig. 2. Histostructure of *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* in the control: А — polygonal fiber profiles, minimum endomysium; Б — perimysial vessels with normostructure; В — nerve trunk without pathology. Fragments of paraffin sections, stained with hematoxylin-eosin, magnification: ×400 (А, В), ×200 (В).

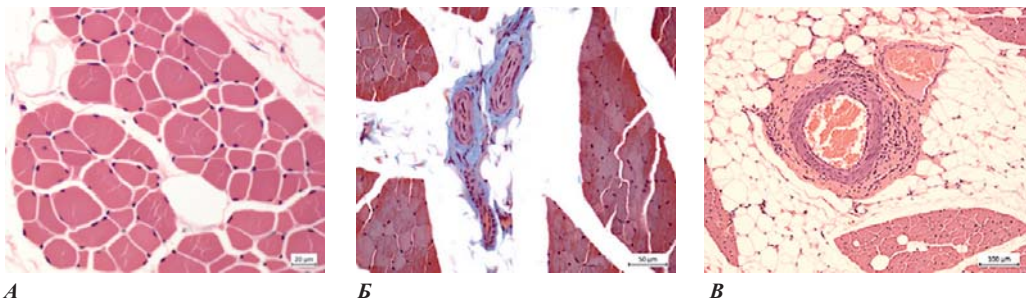


Рис. 3. Гистоструктура *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* через 6 мес. опыта: А — вариабельность размеров миосимпластов, фиброз эндомизия; Б — спазмированные сосуды; В — адвентициальный фиброз в сосуде артериального звена, обширное поле адипоцитов. Фрагменты парафиновых срезов, окраска гематоксилином-эозином, по Массону (Б), увеличение: ×630 (А); ×400 (Б); ×200 (В).

Fig. 3. Histostructure of *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* after 6 months of the experience: А — variability in the size of myosimplasts, endomysial fibrosis; Б — spasmodic vessels; В — adventitial fibrosis in the vessel of the arterial component, an extensive field of adipocytes. Fragments of paraffin sections, stained with hematoxylin-eosin, according to Masson (B), magnification: ×630 (A); ×400 (B); ×200 (B).

стания с признаками воспаления, где также могли наблюдаться одиночные адипоциты или их группы (рис. 4В).

Через 18 мес. гистологическая картина исследуемой мышцы отличалась значительным фиброзом интерстициального пространства. Сохранялось повышенное разнообразие диаметров и профилей мио-симпластов, размеры мышечных волокон в различных полях зрения варьировали (рис. 5А, Б). Встречались перимизиальные сосуды с облитерированными просветами,

преобладали открытые сосуды, без фиброза оболочек (рис. 5В).

По данным стереометрии, через 6 и 12 мес. эксперимента объёмная плотность мышечных волокон в *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* была достоверно ниже параметра в контроле, составив 83% ($p < 0,05$), а к 18 мес. — 85% (табл. 1). При этом объёмная плотность микрососудов составляла 121%, 112% и 96% от нормы на 6, 12 и 18 мес. соответственно. Объём эндомизиальной соединительной ткани сохранял-

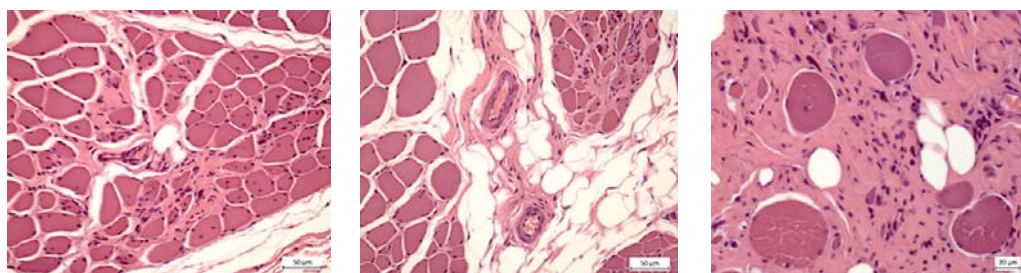


Рис. 4. Гистоструктура *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* через 12 мес.: А — разнообразие диаметров и профилей мышечных волокон, внутренние ядра; Б — адвентициальный фиброз перимизиальных сосудов, адипоциты в перимизии; В — соединительнотканый конгломерат с признаками воспаления, единичные гипертрофированные мышечные волокна, адипоциты. Фрагменты парафиновых срезов, окраска гематоксилином-эозином, увеличение: $\times 400$ (А, Б); $\times 630$ (В).

Fig. 4. Histostructure of *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* after 12 months: А — a variety of diameters and profiles of muscle fibers, internal nuclei; Б — adventitial fibrosis of the perimysial vessels, adipocytes in the perimysium; В — connective tissue conglomerate with signs of inflammation, single hypertrophied muscle fibers, adipocytes. Fragments of paraffin sections, stained with hematoxylin-eosin, magnification: $\times 400$ (А, Б); $\times 630$ (В).

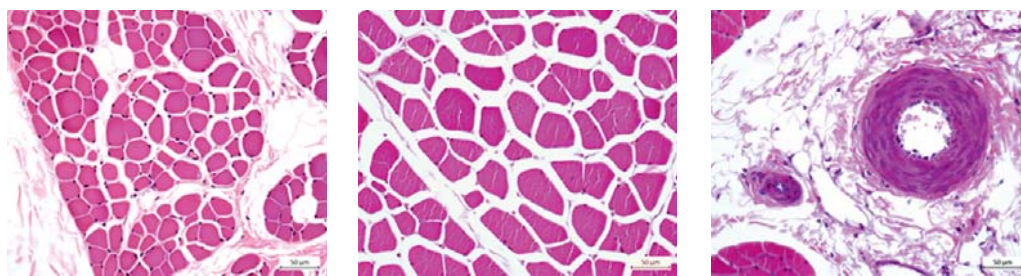


Рис. 5. Гистоструктура *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* на 18 мес. эксперимента: А — различные размеры и профили мышечных волокон; Б — существенный фиброз эндомизия; В — сосуды артериального звена, мелкий с закрытым просветом, для крупного характерно нормостроение. Фрагменты парафиновых срезов, окраска гематоксилином-эозином, увеличение: $\times 400$.

Fig. 5. Histostructure of *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* by the 18th month of the experiment: А — different sizes and profiles of muscle fibers; Б — significant fibrosis of the endomysium; В — vessels of the arterial component, small ones with a closed lumen, the large one is characterized by normal structure. Fragments of paraffin sections, stained with hematoxylin-eosin, magnification: $\times 400$.

ся на одном уровне в ходе эксперимента, превысив контрольный параметр в 2,4 раза ($p < 0,05$). Доля ядерного компонента уменьшалась через 6, 12 и 18 мес., составив 76%, 69% и 62% соответственно, от параметра в норме ($p < 0,05$). Индекс васкуляризации мышечной ткани был ниже контрольного параметра на 6 мес. и возрастал к 12 и 18 мес., составив, соответственно, 78%, 101% и 114% ($p < 0,05$) от контрольного параметра. Степень жировой инфильтрации исследованной мышцы через 6 мес. была максимальной, составив 629% от нормы. Через 12 и 18 мес. данный параметр уменьшался до 327% и 310% соответственно (табл. 2).

Обсуждение результатов

В ходе эксперимента было установлено, что для мышцы характерен фиброз интерстициального пространства, превышающий в 2,4 раза параметр в контроле, и существенная жировая инволюция, превосходящая более чем в 3 раза параметр в норме по окончании опыта. Объёмная плотность ядерного компонента в мышечной ткани уменьшалась в ходе опыта в соответствии со снижением объёмной доли миосимпласов. Через 18 мес. относительный объём

ядер был меньше почти в 2 раза контрольного параметра на фоне несущественного восстановления объёмной плотности мышечных волокон. Заметное уменьшение объёмной плотности ядерного компонента в отдалённый период эксперимента может быть обусловлено увеличением возраста подопытных животных [23], а также их гиподинамией ввиду содержания в клетках. Степень жировой инволюции была максимальной на 6 мес. после операции, что, очевидно, вызвано сильной травматизацией *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis* при оперативном вмешательстве — компрессией и растяжением мышцы. В последующие периоды мышца частично восстанавливалась, индекс жировой инфильтрации уменьшался в 2 раза, но превышал интактный показатель в 3,4 раза.

Полученные данные по уменьшению объёмной плотности миосимпласов, склеротизации и жировой инфильтрации мышцы при экспериментальном оперативном воздействии могут найти своё отражение в клинических исследованиях. Так, уменьшение площади поперечного сечения параспинальной мускулатуры и увеличение инфильтрации жира связывают с болью в пояснице [12]. Уменьшение объёма пара-

Таблица 1. Данные стереологического анализа крестцово-каудальной (копчиковой) дорсальной латеральной мышцы

Table 1. Stereological analysis of *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis*

| Параметры (мм ³ / мм ³) | 6 мес. | 12 мес. | 18 мес. | Контроль |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| VV _{mf} | 0,6975±0,0166 | 0,7001±0,0107 | 0,7181±0,0118 | 0,8439±0,007 |
| VV _{mv} | 0,0272±0,0038 | 0,0251±0,0027 | 0,0216±0,0034 | 0,0225±0,0028 |
| VV _{end} | 0,2428±0,0122 | 0,248±0,0096 | 0,2397±0,0115 | 0,1023±0,0055 |
| VV _n | 0,0238±0,0029 | 0,0216±0,0027 | 0,0195±0,0046 | 0,0312±0,0032 |
| I _{vasc} | 0,7431 | 0,9714 | 1,0925 | 0,9575 |

Примечание: жирным выделены значения, достоверно отличающиеся от параметров в контроле, $p < 0,05$.

Note: values in bold are significantly different from those in the control, $p < 0,05$.

Таблица 2. Жировая инфильтрация (%) в крестцово-каудальной (копчиковой) дорсальной латеральной мышце

Table 2. Fatty infiltration (%) in *m. sacrocaudalis (coccygeus) dorsalis lateralis*

| Параметр | Период | | | Контроль |
|---------------------|--------|---------|---------|----------|
| | 6 мес. | 12 мес. | 18 мес. | |
| Доля (%) адипоцитов | 32,7 | 17,0 | 16,1 | 5,2 |

спинальных мышц коррелирует с кифотической деформацией [8], объём мышц влияет на скорость сращения, функциональную активность и частоту осложнений после операций [15]. Выявлена повышенная экспрессия фиброгенных генов в многораздельных мышцах при патологии позвоночника, это обуславливает необходимость мер по предотвращению фиброгенеза [21]. Жировая инволюция является одним из главных факторов, который берётся во внимание перед хирургическим вмешательством [24]. Необходимо учесть, что в данном исследовании экспериментальные животные содержались в ограниченном пространстве, активные двигательные нагрузки не проводились, что, безусловно, имело значение для восстановления мышечной ткани.

Заключение

Преимуществами использованной техники заднего артротреза илиосакрального сочленения являются небольшой разрез,

минимальная кровопотеря, сохранение целостности большинства связок и короткий период иммобилизации.

Тем не менее при экспериментальном моделировании на животных артротреза крестцово-подвздошного сустава в прилежащей крестцово-каудальной (копчиковой) дорсальной латеральной мышце выявлены фиброзирование интерстициального пространства и жировая инволюция, составившие от интактных параметров 240 и 310% соответственно, в конце эксперимента, а также фиброз оболочек сосудов.

Следовательно, при использовании техники заднего артротреза крестцово-подвздошного сустава (КПС, илиосакральное сочленение) минимизация механического воздействия на мышцы призвана нивелировать процессы фиброгенеза и жировой инволюции паравертебральных мышц, сократив период восстановления мышечной ткани в послеоперационном периоде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Байков Е.С., Вернер Н.Ю. Ключевые моменты формирования межтелового блока после декомпрессивно-стабилизирующих вмешательств на пояснично-крестцовом отделе позвоночника: обзор литературы. *Гений ортопедии*. 2020;26(3):426–431. [Baykov E.S., Verner N.Yu. Klyuchevye momenty formirovaniya mezhtelovogo bloka posle dekompressivno-stabiliziruyushchih vmeshatel'stv na poynichno-krestcovom otdel'e pozvonochnika: obzor literatury [Key points of interbody fusion following surgical decompression and stabilization of the lumbosacral spine: Literature review]. *Geniy Ortopedii [Orthopedic Genius]*. 2020;26(3):426–431. (In Russian)]. DOI: 10.18019/1028-4427-2020-26-3-426-431.
2. Гайдышев И.П. *Моделирование стохастических и детерминированных систем: Руководство пользователя программы AtteStat*. Курган, 2015:484. [Gajdyshv I.P. *Modelirovanie stokhasticheskikh i determinirovannykh sistem: Rukovodstvo pol'zovatelya programmy AtteStat [Modeling of stochastic and deterministic systems: User's Guide for the AtteStat program]*. Kurgan, 2015:484. (In Russian)].
3. ГОСТ 33215-2014 от 22.12.2014 № 73-П. *Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур* [GOST 33215-2014 of 22.12.2014 No. 73-P. *Rukovodstvo po sodержaniyu i ukhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila oborudovaniya pomeshcheniy i organizatsii protsedur [Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for equipping premises and organizing procedures]*. (In Russian)].
4. ГОСТ Р 33044-2014 от 20.10.2014 № 71-П. *Принципы надлежащей лабораторной практики* [GOST R 33044-2014 of 20.10.2014 No. 71-P. *Printsipy nadlezhashchey laboratornoy praktiki [Principles of Good Laboratory Practice]*. (In Russian)].
5. Жалмагамбетов К.Л., Рябых С.О., Жданов А.С., Губин А.В. Применение транспедикулярной спинальной системы и блок-решётки при оперативном лечении посттравматической деформации таза: случай из практики и краткий анализ литературы. *Гений ортопедии*. 2021;27(1):97–103. [Zhalmagambetov K.L., Ryabykh S.O., Zhdanov A.S., Gubin A.V. *Primenenie transpedikulyarnoy spinal'noy sistemy i blok-reshetki pri operativnom lechenii post-travmaticheskoy deformatsii taza: sluchay iz praktiki i kratkiy analiz literatury [The use of the transpedic-*

- ular spinal system and titanium mesh cage in surgical treatment of post-traumatic pelvic deformity: A case study and a brief literature review]. *Geniy Ortopedii [Orthopedic Genius]*. 2021;27(1):97–103. (In Russian)]. DOI: 10.18019/1028-4427-2021-27-1-97-103.
6. СП 2.2.1.3218-14 от 31.10.2014 № 34547 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (vivariumov)» [SP 2.2.1.3218-14 of 31.10.2014 No. 34547 “Sanitararno-epidemiologicheskie trebovaniya k ustroystvu, oborudovaniyu i soderzhaniyu eksperimental’no-biologicheskikh klinik (vivariumov)” [“Sanitary and epidemiological requirements for the arrangement, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums)”]. (In Russian)].
 7. Щурова Е.Н., Филимонова Г.Н., Рябых С.О. Влияние величины деформации в грудном отделе позвоночника на морфологическую картину параспинальных мышц у больных с идиопатическим сколиозом тяжёлой степени. *Гений ортопедии*. 2021;27(1):68–73. [Shchurova E.N., Filimonova G.N., Ryabykh S.O. Vliyaniye velichiny deformatsii v grudnom otdel pozvonochnika na morfologicheskuyu kartinu paraspinal’nykh myshts u bol’nykh s idiopatcheskim skoliozom tyazhelyoy stepeni [Influence of the magnitude of deformity in the thoracic spine on the morphological picture of the paraspinal muscles in patients with severe idiopathic scoliosis]. *Geniy Ortopedii [Orthopedic Genius]*. 2021;27(1):68–73. (In Russian)]. DOI: 10.18019/1028-4427-2021-27-1-68-73.
 8. Bok D.H., Kim J., Kim T.H. Comparison of MRI-defined back muscles volume between patients with ankylosing spondylitis and control patients with chronic back pain: Age and spinopelvic alignment matched study. *Eur. Spine J.* 2017;26(2):528–537. DOI: 10.1007/s00586-016-4889-2.
 9. Chen L.Y., Liang H.D., Qin Q.N., Tian T.Z., Liu B.X., Shi M., Cai Y.F. Sacroiliac joint fusion VS conservative management for chronic low back pain attributed to the sacroiliac joint: A protocol for systematic review and meta analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(46):e32223. DOI: 10.1097/MD.0000000000003223.
 10. Duhon B.S., Cher D.J., Wine K.D., Kovalsky D.A., Lockstadt H. SIFI Study Group. Triangular titanium implants for minimally invasive sacroiliac joint fusion: A prospective study. *Global Spine J.* 2016;6(3):257–269. DOI: 10.1055/s-0035-1562912.
 11. Falowski S., Sayed D., Pope J., Patterson D., Fishman M., Gupta M., Mehta P. A review and algorithm in the diagnosis and treatment of sacroiliac joint pain. *J. Pain Res.* 2020;13:3337–3348. DOI: 10.2147/JPR.S279390.
 12. He K., Head J., Mouchtouris N., Hines K., Shea P., Schmidt R., Hoelscher C., Stricsek G., Harrop J., Sharan A. The implications of paraspinal muscle atrophy in low back pain, thoracolumbar pathology, and clinical outcomes after spine surgery: A review of the literature. *Global Spine J.* 2020;10(5):657–666. DOI: 10.1177/2192568219879087.
 13. Himstead A.S., Brown N.J., Shahrestani S., Tran K., Davies J.L., Oh M. Trends in diagnosis and treatment of sacroiliac joint pathology over the past 10 years: Review of scientific evidence for new devices for sacroiliac joint fusion. *Cureus*. 2021;13(6):e15415. DOI: 10.7759/cureus.15415.
 14. Joukar A., Kiapour A., Elgafy H., Erbulut D.U., Agarwal A.K., Goel V.K. Biomechanics of the sacroiliac joint: Surgical treatments. *Int. J. Spine Surg.* 2020;14(3):355–367. DOI: 10.14444/7047.
 15. Khan A.B., Weiss E.H., Khan A.W., Omeis I., Verla T. Back muscle morphometry: Effects on outcomes of spine surgery. *World Neurosurg.* 2017;103:174–179. DOI: 10.1016/j.wneu.2017.03.097.
 16. King W., Ahmed S.U., Baisden J., Patel N., Kennedy D.J., Duszynski B., MacVicar J. Diagnosis and treatment of posterior sacroiliac complex pain: A systematic review with comprehensive analysis of the published data. *Pain Med.* 2015;16(2):257–265. DOI: 10.1111/pme.12630.
 17. Lorio M., Kube R., Araghi A. International Society for the Advancement of Spine Surgery Policy 2020 update-minimally invasive surgical sacroiliac joint fusion (for chronic sacroiliac joint pain): Coverage indications, limitations, and medical necessity. *Int. J. Spine Surg.* 2020;14(6):860–895. DOI: 10.14444/7156.
 18. Patel V., Kovalsky D., Meyer S.C., Chowdhary A., LaCombe J., Lockstadt H., Techy F., Langel C., Limoni R., Yuan P., Kranenburg A., Cher D., Tender G. Prospective trial of sacroiliac joint fusion using 3D-printed triangular titanium implants: 24-month follow-up. *Med. Devices (Auckl)*. 2021;14:211–216. DOI: 10.2147/MDER.S314828.
 19. Rudolf L. Sacroiliac joint arthrodesis-MIS technique with titanium implants: Report of the first 50 patients and outcomes. *Open Orthop. J.* 2012;6:495–502. DOI: 10.2174/1874325001206010495.
 20. Rudolf L., Capobianco R. Five-year clinical and radiographic outcomes after minimally invasive sacroiliac joint fusion using triangular implants. *Open Orthop. J.* 2014;8:375–383. DOI: 10.2174/1874325001408010375.
 21. Shahidi B., Fisch K.M., Gibbons M.C., Ward S.R. Increased fibrogenic gene expression in multifidus muscles of patients with chronic versus acute lumbar spine pathology. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2020;45(4):E189–E195. DOI: 10.1097/BRS.0000000000003243.
 22. Shamrock A.G., Patel A., Alam M., Shamrock K.H., Al Maaieh M. The safety profile of percutaneous minimally invasive sacroiliac joint fusion. *Global Spine J.* 2019;9(8):874–880. DOI: 10.1177/2192568218816981.
 23. Sousa-Victor P., Gutarra S., Garcia-Prat L., Rodriguez-Ubreva J., Ortet L., Ruiz-Bonilla V., Jar-

di M., Ballestar E., González S., Serrano A.L., Perdiguer E., Muñoz-Cánoves P. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature*. 2014;506(7488):316–321. DOI: 10.1038/nature13013.

24. Storheim K., Berg L., Hellum C., Gjertsen Ø., Neckelmann G., Espeland A., Keller A., Norwegian

Spine Study Group. Fat in the lumbar multifidus muscles — predictive value and change following disc prosthesis surgery and multidisciplinary rehabilitation in patients with chronic low back pain and degenerative disc: 2-year follow-up of a randomized trial. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2017;18(1):145. DOI: 10.1186/s12891-017-1505-5.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Филимонова Галина Николаевна*, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. академика Г.А. Илизарова» Минздрава России;

e-mail: galnik.kurgan@yandex.ru

Дюрягина Ольга Владимировна, к.вет.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. академика Г.А. Илизарова» Минздрава России;

e-mail: diuriagina@mail.ru

Антонов Николай Иванович, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. академика Г.А. Илизарова» Минздрава России;

e-mail: aniv-niko@mail.ru

Galina N. Filimonova*, Cand. Sci. (Biol.), National Ilizarov Medical Research Centre for Traumatology and Orthopaedics of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: galnik.kurgan@yandex.ru

Olga V. Diuriagina, Cand. Sci. (Vet.), National Ilizarov Medical Research Centre for Traumatology and Orthopaedics of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: diuriagina@mail.ru

Nikolai I. Antonov, Cand. Sci. (Biol.), National Ilizarov Medical Research Centre for Traumatology and Orthopaedics of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: aniv-niko@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



НАРУШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ мРНК МЮ- И КАППА-ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В СРЕДНЕМ МОЗГЕ КРЫС С ПРЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ

В.С. Кохан^{1,*}, П.К. Анохин¹, Е.П. Пахлова², Н.Ю. Сарычева², И.Ю. Шамакина¹

¹ Национальный научный центр наркологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России 119002, Российская Федерация, Москва, Малый Могильцевский пер., 3

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» 119234, Российская Федерация, Москва, ул. Ленинские горы, 1/12

Нарушение эпигенетического репрограммирования под действием экзогенных факторов в пренатальном периоде отражается на развитии и формировании фенотипа взрослого организма. Один из таких факторов — алкоголь, воздействие которого в период пренатального онтогенеза может приводить к высокому риску злоупотребления алкоголем в будущем. Механизмы, лежащие в основе этого эффекта, в настоящее время мало изучены. Мы предполагаем, что изменение «подкрепляющего» действия алкоголя в результате пренатальной алкоголизации может быть связано с нарушением транскрипционной активности генов опиоидной системы мозга. В работе проведён сравнительный анализ добровольного потребления алкоголя и уровня экспрессии мРНК μ - (МОР) и κ -опиоидных (КОР) рецепторов в мезолимбических областях мозга взрослых крыс-самцов Wistar (PND60) — потомков самок, потреблявших 10%-ный р-р этанола со 2-го по 21-й дни беременности, и контрольных животных. Пренатально алкоголизованные крысы отличались от контрольных высоким предпочтением алкоголя и низким уровнем экспрессии мРНК МОР и КОР в среднем мозге. Выявленные нарушения могут лежать в основе дисфункции опиатной системы и, как следствие, высокого риска формирования аддиктивного поведения во взрослом возрасте.

Ключевые слова: алкоголь, мозг, пренатальный период, потомство, поведение, опиатные рецепторы, экспрессия мРНК

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликтов интересов.

Для цитирования: Кохан В.С., Анохин П.К., Пахлова Е.П., Сарычева Н.Ю., Шамакина И.Ю. Нарушение экспрессии мРНК μ - и κ -опиоидных рецепторов в среднем мозге крыс с пренатальной алкогольной интоксикацией. *Биомедицина*. 2022;18(4):112–122. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-112-122>

Поступила 07.09.2022

Принята после доработки 17.10.2022

Опубликована 10.12.2022

IMPAIRED EXPRESSION OF MU- AND KAPPA-OPIOID RECEPTOR mRNA IN THE MIDBRAIN OF RATS WITH PRENATAL ALCOHOL INTOXICATION

Viktor S. Kokhan^{1*}, Petr K. Anokhin¹, Ekaterina P. Pakhlova², Natalia Yu. Sarycheva²,
Inna Yu. Shamakina¹

¹ National Scientific Center for Narcology — Branch of the V.P. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health Care of Russia
119002, Russian Federation, Moscow, Maliy Mogiltsevskiy Lane, 3

² Lomonosov Moscow State University
119234, Russian Federation, Moscow, Leninskiye Gory Str., 1/12

Disruption of normal epigenetic reprogramming during the prenatal period under the influence of exogenous factors affects fetus development and adult phenotype formation. The mechanisms through which determinants, such as maternal alcohol intake, contribute to the formation of an alcohol-vulnerable phenotype later in life still remain unclear. In this paper, we suggest that alteration in the reinforcing properties of ethanol in prenatally alcohol-exposed subjects may be associated with transcriptional dysregulation of the brain opioid receptor genes. We compared voluntary alcohol intake and levels of mRNA coding for μ - (MOP) and κ -opioid (KOP) receptors in the mesolimbic areas of adult male offspring of the female Wistar rats having received 10% ethanol as the only source of liquid throughout pregnancy or water (control). We found that prenatally alcohol exposed rats had higher alcohol preference on PND60 (free-choice paradigm) and lower mRNA expression for both MOP and KOP in the midbrain compared to the control. This suggests a potential link between prenatal alcohol, dysfunction of the brain opiate system and adult vulnerability for alcohol use disorder.

Keywords: alcohol, brain, prenatal period, offspring, behavior, opiate receptors, mRNA expression

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

For citation: Kokhan V.S., Anokhin P.K., Pakhlova E.P., Sarycheva N.Yu., Shamakina I.Yu. Impaired Expression of Mu- and Kappa-Opioid Receptor mRNA in the Midbrain of Rats with Prenatal Alcohol Intoxication. *Journal Biomed.* 2022;18(4):112–122. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-112-122>

Submitted 07.09.2022

Revised 17.10.2022

Published 10.12.2022

Введение

Употребление алкоголя во время беременности является причиной развития физиологических, психических, поведенческих и интеллектуальных отклонений у потомства, объединяемых термином «фетального алкогольного спектра нарушения» (ФАСН) [5]. Согласно эпидемиологическим данным, частота встречаемости ФАСН у детей в разных странах составляет от 3,1 до 17% [23, 28].

Одной из наиболее сложных и актуальных проблем, связанных с проявлениями ФАСН, является определение риска зло-

употребления алкоголем и др. психоактивными веществами (ПАВ) во взрослом возрасте [19]. Показано, что пренатальная алкоголизация увеличивает риск злоупотребления алкоголем в подростковом периоде и является предиктором подросткового алкоголизма, а вероятность возникновения алкогольной зависимости значительно возрастает при сочетании пренатальной алкоголизации и ранних первых проб алкоголя в детском и подростковом возрасте [2, 4]. Показано, что 46% подростков, перенёвших пренатальную алкогольную интоксикацию, злоупотребляли алкоголем в возрасте стар-

ше 21-го года [31]. Нейрохимические и молекулярные механизмы, лежащие в основе высокого риска злоупотребления алкоголем у подростков с ФАСН, до сих пор мало изучены, и их выяснение невозможно без использования экспериментальных моделей на животных.

В экспериментальных исследованиях ФАСН широко используется модель пренатальной алкоголизации грызунов — «полупринудительное потребление», когда животные получают в качестве единственного источника жидкости р-р этанола (6–15%). Согласно данным [3], при использовании такой схемы эксперимента животные получают в среднем 14 г/кг абсолютного спирта в сутки, а концентрация алкоголя в крови достигает 1,2 г/л. Преимущество описанной модели заключается в её простоте и минимизации дополнительных стрессорных факторов и рисков, которые могут привести к потере потомства.

В результате исследований, проведённых на животных, были высказаны предположения, что плод может приобретать «память» о связанных с этанолом сенсорных сигналах и воспроизводить в памяти этот пренатальный опыт [25, 30]. Действительно, установлено, что пренатальное воздействие этанола меняет чувствительность потомства к специфическим хемосенсорным характеристикам этанола. Так, воздействие этанола в пренатальном периоде приводило к формированию безусловной поведенческой реакции предпочтения запаха этанола у крыс на 15-й день после рождения [35], а также увеличивало потребление этанола во взрослом возрасте [36]. Авторы объяснили описанный эффект снижением количества нейронов в ядрах тройничного нерва ствола мозга в результате пренатального воздействия алкоголя, приводящим к сокращению каналов стимуляции и снижению вкусового восприятию этанола [34]. Кроме того, не исключается возможность нарушения этанолом функций рецептора

капсаицина, с активацией которого связана аверсивная реакция на вкус этанола [33]. На основании полученных результатов можно предположить, что пренатальное воздействие этанола изменяет обонятельное и вкусовое восприятие этанола у животных в сторону уменьшения аверсивной реакции на этанол, однако данный факт не исключает наличия других изменений функций центральной нервной системы, приводящих к росту предпочтения алкоголя во взрослом возрасте.

В исследованиях с применением электростимуляции различных областей мозга установлено, что центральным звеном т. н. «системы награды» являются мезокортиколимбические области [15]. Регуляция активности дофаминовых (DA) нейронов, тела которых локализованы в вентральной покрышке (VTA) среднего мозга, осуществляется при непосредственном участии μ - и κ -опиоидной систем. Особое внимание исследователей привлечено в последнее время к роли динорфин/ κ -опиоидной системы мозга в формировании зависимости от ПАВ [6]. Показано, что стимуляция динорфинергической нейротрансмиссии и КОР-рецепторов, локализованных на пресинаптических окончаниях и телах DA нейронов VTA, подавляет их активность и снижает высвобождение DA в мезокортиколимбической системе [21], а антагонистов КОР — повышение уровня дофамина в прилежащем ядре (NAc) [13]. Введение динорфина и агонистов КОР-рецепторов оказывает аверсивный, продисфорический и депрессогенный эффект [29].

Динорфин-экспрессирующие нейроны стриатума, оканчивающиеся как на телах DA нейронов VTA, так и на их пресинаптических окончаниях, выступают, по-видимому, в качестве системы отрицательной обратной связи, играющей «защитную» роль на начальных этапах формирования зависимости. Возможно, с активацией

именно этой системы связан аверсивный компонент эффекта первых проб алкоголя. Мы предполагаем, что изменение «подкрепляющего» действия алкоголя в результате пренатальной алкоголизации может быть связано с нарушением транскрипционной активности генов дофаминовой и опиоидной систем мозга. Последнее время проводится активное изучение влияния различных экзогенных факторов окружающей среды на изменение экспрессии генов, активно транскрибирующихся в развивающемся и взрослом мозге и играющих ключевую роль в поддержании гомеостатического состояния организма [12, 24, 37]. Ранее было показано влияние пренатальной алкоголизации на процесс метилирования генов в мозге [18, 20, 22], что может быть косвенным подтверждением стойких долговременных эффектов пренатальной алкоголизации на уровень транскрипционной активности генов в мозге.

Целью настоящего исследования были оценка уровня предпочтения алкоголя взрослыми животными, перенёсшими пренатальную алкоголизацию, и сравнительный анализ уровня экспрессии мРНК ключевых белков дофаминовой (тирозингидроксилазы — TH, транспортера дофамина — DAT) и опиоидной (MOP и KOP) систем в среднем мозге пренатально алкоголизированных и контрольных животных.

С практической точки зрения, экспериментальное изучение нарушений экспрессии мРНК в мозге взрослых животных с пренатальной алкогольной интоксикацией приведёт к более полному пониманию патогенеза ФАЧН и разработке эффективных средств профилактики и терапии.

Материалы и методы

Животные

Эксперименты проводились на аутбредных крысах-самцах Wistar (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России).

В период адаптации к условиям вивария животных содержали по 8 крыс в одной клетке, в условиях естественной освещённости при температуре 22 ± 2 °C и свободном доступе к пище и воде.

Модель пренатальной алкоголизации

Двух половозрелых самок в возрасте 60 дней подсаживали к одному самцу на 3 сут (рис. 1). Общее количество самцов — 10, самок — 20. Первым днём беременности считался день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке. Самок, спаривавшихся с одним самцом, случайным образом делили на две группы: самки опытной группы на протяжении всей беременности (со 2-го по 21-й дни) получали 10%-ный р-р этанола в качестве единственного источника жидкости, для контрольных самок единственным источником жидкости была вода.

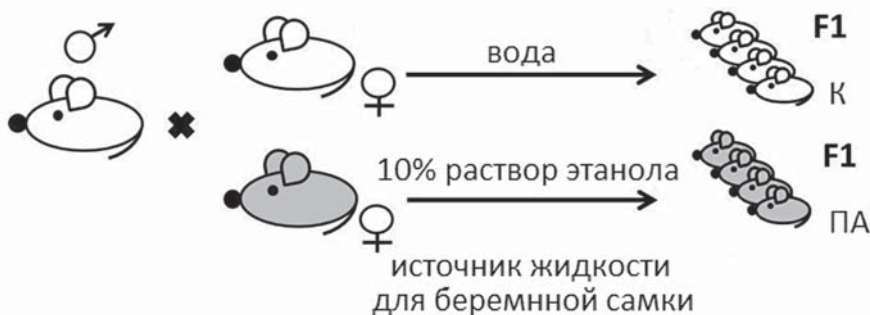


Рис. 1. Схема получения потомства F1: контрольного (K) и пренатально алкоголизированного (ПА).
Fig. 1. Scheme of obtaining F1 progeny: control (K) and prenatally alcohol exposed (PA).

До рождения детёнышей самок содержали по 5 крыс в одной клетке при свободном доступе к пище. После рождения детёнышей на период вскармливания все самки помещались в индивидуальные клетки и переводились на водный режим. На 30-й день жизни детёнышей отделяли от матери, разделяли по гендерному признаку и в дальнейшем содержали по 8 крыс в одной клетке при свободном доступе к пище и воде. Все эксперименты в дальнейшем проводились на половозрелых самцах — потомках интактных (контрольная группа; К) и алкоголизованных во время беременности самок (группа ПА, «пренатально алкоголизованные»). Для изучения потребления алкоголя и экспрессии генов использовали различных животных, отбор проводили таким образом, чтобы все помёты были равноценно представлены в ПА и К группах.

Потребление алкоголя

Для изучения уровня предпочтения этанола использовали экспериментальную модель «свободный выбор» [11]. Для этого крысы-потомки в возрасте 60 дней были помещены в индивидуальные клетки в условия «свободного выбора» между двумя поилками, содержащими 10%-ный р-р этанола и воду. Потребление этанола и воды измеряли ежедневно путём взвешивания поилок и расчёта уровня потребления в граммах на килограмм массы животного (г/кг).

Забор биологического материала

Животных в возрасте 60 дней декапировали, выделяли средний мозг на льду, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для выделения тотальной РНК из мозга животных использовали набор «RNeasy Lipid Tissue Mini Kit» (Qiagen, США). 1 мкг РНК использовали в реакции обратной транскрипции для синтеза кДНК с помощью набора «Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit» (Fermentas, США).

Водный раствор кДНК хранили при -70°C . Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для количественной ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе «Multicolor Real-Time PCR Detection System iQ7W5» (BioRad, США). При проведении ПЦР использовались олигонуклеотидные праймеры, приведённые в таблице. Амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 25 нг матрицы (кДНК), праймеры в конечной концентрации 0,4 мкМ и 5 мкл 5-кратной реакционной смеси «qPCRmix-HS SYBR» (Евроген, Россия) в следующем режиме: исходная денатурация матрицы — 3 мин при 95°C ; денатурация — 95°C , 15 с; отжиг праймеров — 60°C , 15 с; элонгация — 72°C , 30 с; 35 циклов. Для нормализации данных в качестве референсного был выбран ген β -актина. Для сравнения уровней экспрессии интересующих генов в опыте и контроле использовали метод $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Статистическая обработка данных

Статистические расчёты производили с помощью программного пакета Statistica 12 (Statsoft Inc., США). Для проверки нормальности распределения количественных данных использовали критерий Шапиро—Уилка. Т. к. все выборки подчинялись нормальному распределению ($p > 0,05$; тест Шапиро—Уилка), результаты представлялись как «среднее \pm стандартная ошибка среднего» (SEM). Для оценки статистической значимости различий в потреблении этанола был использован двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с повторными измерениями; апостериорный анализ с использованием критерия наименьшей значимой разницы (LSD) Фишера был использован, когда это было необходимо. Для оценки межгрупповых различий уровня мРНК использовали t-критерий Стьюдента.

Биоэтика

Эксперименты с животными были проведены в соответствии с Правилами надлежа-

Таблица. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для проведения ПЦР в реальном времени

Table. Sequences of oligonucleotide primers used for real-time PCR

| Ген | Праймеры | |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| | Прямой | Обратный |
| КОР, κ-опиоидный рецептор | 5'-tcaggggaagatgtggatgtcaatt-3' | 5'-tgaagaggtccccaccaggaa-3' |
| МОΡ, μ-опиоидный рецептор | 5'-gtagtgggcctctcgaaac-3' | 5'-gttggtggcagcttctatttg-3' |
| ТН, тирозингидроксилаза | 5'-tcggaagctgattgcagaga-3' | 5'-ttcgcctgtgtattccacatg-3' |
| DAT, транспортёр дофамина | 5'-aatgtctcgtgggaccaatg-3' | 5'-caataacatgaagagcagg-3' |
| β-актин | 5'-cactgccgcctcctctct-3' | 5'-aacgcctcattgccgatagtg-3' |

щей лабораторной практики в Российской Федерации (01.04.2016 г.) и требованиями директивы 2010/63/EU от 22.09.2010 г. Европейского Парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в лабораторных экспериментах. Работа утверждена протоколом биоэтической комиссии ФГБУ «НМИЦПН им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Результаты исследований

Влияние пренатального воздействия этанола на алкогольную мотивацию экспериментальных животных

По результатам тестирования с 60-го по 65-й дни жизни в условиях «свободного

выбора» между двумя поилками, содержащими 10%-ный р-р этанола и воду, было установлено достоверное увеличение потребления (рис. 2А) алкоголя ПА животными в первые 3 дня тестирования, соответственно на 53% ($p=0,04$), 174% ($p=0,03$) и 119% ($p=0,04$) по сравнению с К группой крыс. Также было обнаружено повышенное предпочтение этанола ПА крысами (рис. 2Б) в первые 3 дня тестирования, соответственно, в 1,6 ($p=0,04$), 2,5 ($p=0,03$) и 1,9 ($p=0,04$) раза по сравнению с К группой крыс. Интересно, что у контрольных крыс отмечалось характерное снижение потребления этанола на второй день тестирования — на 44% ($p=0,02$), тогда как у ПА жи-

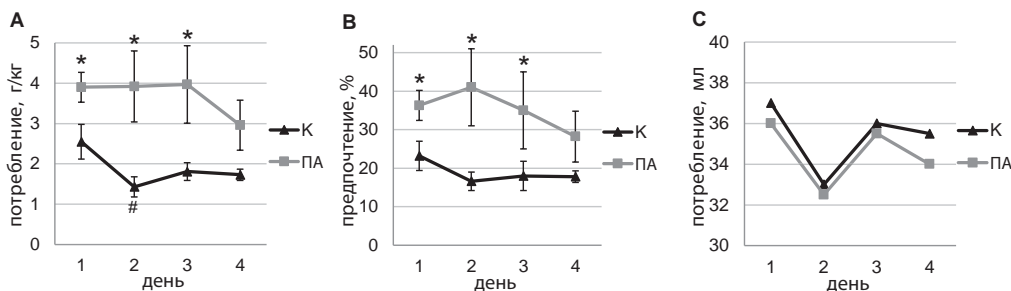


Рис. 2. Потребление этанола и жидкости в условиях свободного выбора. А — среднесуточный уровень потребления в пересчёте на 100% этанол, г/кг; В — предпочтение алкоголя, выраженное в % к общему объёму выпитой жидкости; С — среднесуточный объём потреблённой жидкости, мл. К, n=10 — контрольная группа; ПА, n=10 — группа пренатально алкоголизированных крыс.

Примечание: межгрупповые различия: * — $p < 0,05$ (апостериорный тест LSD); различия внутри групп по сравнению с 1-м днём тестирования: # — $p < 0,05$ (апостериорный тест LSD).

Fig. 2. Ethanol and liquid consumption under free choice paradigm. А — mean daily intake in terms of 100% ethanol, g/kg; В — alcohol preference expressed as % of total liquid intake; С — mean daily liquid intake, ml. К, n=10 — control group; ПА, n=10 — group of prenatally alcohol exposed rats.

Note: intergroup differences: * — $p < 0.05$ (LSD post hoc test); intra-group differences compared with day 1 testing: # — $p < 0.05$ (LSD post hoc test).

вотных уровень потребления в первые дни тестирования сохранялся постоянно высоким (рис. 2А). Важно, что полученные различия не были связаны с нарушением питьевого поведения, т. к. общие объёмы потребляемой жидкости не отличались в опытной и контрольной группах (рис. 2В).

Влияние пренатального воздействия этанола на уровень экспрессии КОР, МОР, ТН и DAT

Мы не обнаружили достоверных изменений экспрессии мРНК ТН и DAT в среднем мозге ПА группы крыс по сравнению с контролем. Вместе с тем было обнаружено достоверное снижение уровня мРНК МОР и КОР в среднем мозге ПА группы крыс, соответственно, на 48% ($p=0,03$) и 68% ($p=0,008$) по сравнению с контрольной группой (рис. 3).

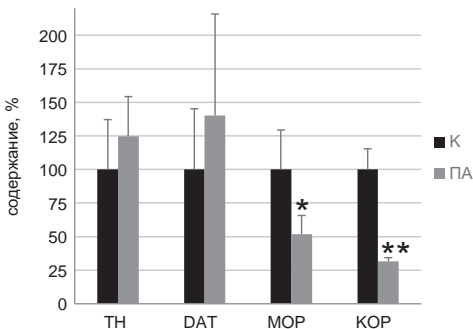


Рис. 3. Относительный уровень содержания мРНК тирозингидроксилазы (ТН), транспортера дофамина (DAT), μ -опиоидных рецепторов (МОР) и κ -опиоидных рецепторов (КОР) в среднем мозге. Содержание — относительное содержание мРНК целевого гена, выраженное в % от содержания в контрольной группе, принятого за 100%. К, $n=10$ — контрольная группа; ПА, $n=10$ — группа пренатально алкоголизированных крыс. **Примечание:** межгрупповые различия: * — $p<0,05$; ** — $p<0,01$ (t-критерий Стьюдента).

Fig. 3. Relative levels of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine transporter (DAT), μ -opioid receptor (MOR), and κ -opioid receptor (KOR) mRNA content in midbrain. Content is the relative mRNA content of the target gene expressed as % of the content in the control group, taken as 100%. K, $n=10$ — control group; PA, $n=10$ — group of prenatally alcohol exposed rats.

Note: intergroup differences: * — $p<0.05$; ** — $p<0.01$ (Student's t-test).

Обсуждение результатов

Полученные данные свидетельствуют об увеличении потребления алкоголя ПА крысами в условиях свободного выбора и согласуются с клиническими наблюдениями, свидетельствующими, что пренатальное действие этанола увеличивает риск злоупотребления алкоголем в подростковом и взрослом возрасте [2, 4], а также экспериментальными данными, показавшими увеличение потребления этанола пренатально алкоголизированными животными во взрослом возрасте [36]. Т. к., полагаясь на литературные данные, эффект алкоголя на поведение может быть связан с функциональным состоянием опиоид-зависимых механизмов, контролирующих активность мезолимбической дофаминовой системы [9], мы изучали уровень экспрессии мРНК μ - и κ -опиоидных рецепторов, а также ключевого фермента синтеза дофамина ТН и пресинаптического транспортера DAT. Анализируя полученные данные, можно предположить, что наблюдаемый рост предпочтения алкоголя у ПА крыс не связан с долговременным изменением функций синтеза или обратного захвата дофамина вследствие изменений уровня транскрипции ТН и DAT. Вместе с тем изменение транскрипции МОР и КОР может быть вовлечено в модуляцию предпочтения алкоголя. Как известно, МОР- и КОР-рецепторы представляют две функционально антагонистичные друг другу системы, обеспечивающие функции системы «награды» (reward system) и её отрицательной регуляции (anti-reward system) [14].

Как уже отмечалось, неотъемлемым свойством всех ПАВ, вызывающих зависимость, включая этанол, является способность вызывать повышение уровня дофамина в НАс [15]. Показано, что для этанола одним из механизмов этой активации может быть освобождение β -эндорфина, активирующего МОР, лока-

лизированные на ГАМК-ергических нейронах VTA и, как следствие, дисингибирование (растормаживание) DA нейронов VTA и освобождение DA в областях-мишенях [7]. Антиподом β -эндорфина является динорфин — эндогенный опиоидный пептид, проявляющий преимущественную тропность к KOR [9]. Его психотропные поведенческие эффекты во многом противоположны таковым агонистов MOR: введение динорфина или агонистов KOR оказывает аверсивное, протидисфорическое и депрессогенное действие у человека и у животных [29]. Активация KOR, локализованных на телах и пресинаптических окончаниях DA нейронов VTA, наблюдается при действии алкоголя и, как предполагается, лежит в основе эффекта его «последствия». Таким образом, динорфин-KOR система выполняет функцию отрицательной обратной связи, регулируя DA-ергическую нейротрансмиссию в мезолимбической системе [16]. Необходимо отметить, что противоположный эффект активации опиоидных рецепторов на освобождение дофамина в областях-мишенях связан, прежде всего, с различной локализацией этих рецепторов: KOR — на пресинаптических окончаниях дофаминовых нейронов VTA в стриатуме (NAc), а MOR — на окончаниях ГАМК-ергических вставочных нейронов VTA (рис. 4).

Снижение уровня как MOR, так и KOR мРНК в среднем мозге может говорить о двойном эффекте пренатальной алкоголизации, приводящей к менее выраженному MOR-зависимому положительно-подкрепляющему эффекту алкоголя и, в то же время, к меньшей эффективности KOR-зависимого механизма отрицательной обратной связи [17]. Можно предполагать, что нарушение KOR-зависимой регуляции дофаминовой нейротрансмиссии у пренатально алкоголизованных животных может лежать в основе отсутствия характерного снижения потребления алко-

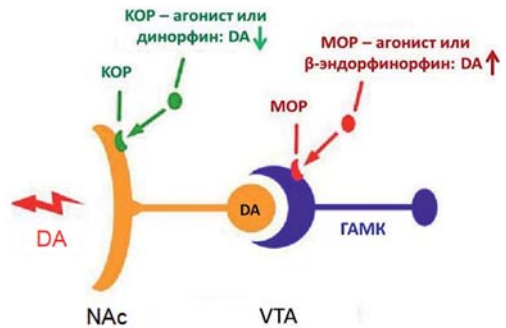


Рис. 4. Влияние стимуляции μ -опиоидного (MOR) и κ -опиоидного (KOR) рецепторов на активность мезолимбической дофаминовой системы.

Примечания: зеленым отмечен путь, приводящий к снижению (\downarrow) уровня дофамина (DA), красным — путь, приводящий к повышению (\uparrow) уровня DA. NAc — прилежащее ядро, VTA — вентральная область покрышки, ГАМК — γ -аминомасляная кислота.

Fig. 4. Effect of μ -opioid (MOR) and κ -opioid (KOR) receptor stimulation on the activity of the mesolimbic dopamine system.

Notes: the pathway leading to a decrease (\downarrow) in dopamine (DA) levels is marked in green, the pathway leading to an increase (\uparrow) in DA levels is marked in red. NAc — nucleus accumbens, VTA — ventral tegmental area, GABA (ГАМК) — γ -aminobutyric acid.

голя (аверсивной «защитной» реакции) на 2-й день эксперимента в модели «свободный выбор».

Полученные данные согласуются с результатами исследований [26], показавшими, что у 14–15-дневного потомства самок крыс, получавших внутривенно 1 г/кг р-ра этанола на поздних сроках беременности (17–20-е дни), снижена экспрессия KOR в синапсомальной фракции стриатума, и не проявляются поведенческие реакции на введение агонистов и антагонистов KOR рецепторов.

Таким образом, результаты работы подтверждают существующее представление о роли динорфин/ κ -опиоидной системы при действии алкоголя [27]. Можно предполагать, что её дисфункция вследствие снижения экспрессии мРНК KOR в среднем мозге может приводить к ослаблению аверсивных эффектов алкоголя и, как след-

ствии, его более высокому предпочтению у животных с пренатальной алкогольной интоксикацией.

Полученные данные позволяют предположить, что высокий риск потребления алкоголя у пренатально алкоголизированных животных во взрослом возрасте в значительной степени может быть обусловлен нарушением эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов, кодирующих ключевые белки опиатной системы в мезолимбических областях мозга.

Активация опиатных рецепторов, сопряжённых с ингибиторными G-белками, снижает внутриклеточную концентрацию цАМФ и возбудимость мембраны

посредством активации K^+ -каналов и ингибирования Ca^{2+} -каналов, что приводит к подавлению активности нейрона, а также торможению пресинаптических процессов высвобождения нейромедиаторов [1, 10]. При этом важно, что агонисты MOR и KOR имеют противоположно направленное действие на активность мезолимбических дофаминовых нейронов. Если активация MOR приводит к их «растормаживанию» и освобождению дофамина, то активация динорфин/к-опиоидной системы является важнейшим из механизмов «противодействия» гиперактивации дофаминовых нейронов VTA и восстановления баланса дофамина в мозге [8, 32].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Al-Hasani R., Bruchas M.R. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*. 2011;115(6):1363–1381. DOI: 10.1097/ALN.0b013e318238bba6.
2. Alati R., Al Mamun A., Williams G.M., O'Callaghan M., Najman J.M., Bor W. In utero alcohol exposure and prediction of alcohol disorders in early adulthood: A birth cohort study. *Arch. Gen. Psychiatry*. 2006;63(9):1009–1016. DOI: 10.1001/archpsyc.63.9.1009.
3. Allan A.M., Chynoweth J., Tyler L.A., Caldwell K.K. A mouse model of prenatal ethanol exposure using a voluntary drinking paradigm. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2003;27(12):2009–2016. DOI: 10.1097/01.ALC.0000100940.95053.72.
4. Baer J.S., Sampson P.D., Barr H.M., Connor P.D., Streissguth A.P. A 21-year longitudinal analysis of the effects of prenatal alcohol exposure on young adult drinking. *Arch. Gen. Psychiatry*. 2003;60(4):377–385. DOI: 10.1001/archpsyc.60.4.377.
5. Basavarajappa B.S., Subbanna S. Epigenetic mechanisms in developmental alcohol-induced neurobehavioral deficits. *Brain Sci*. 2016;6(2):12. DOI: 10.3390/brainsci6020012.
6. Bazov I., Sarkisyan D., Kononenko O., Watanabe H., Taqi M.M., Stålhandske L., Verbeek D.S., Mulder J., Rajkowska G., Sheedy D., Kril J., Sun X., Syvänen A.C., Yakovleva T., Bakalkin G. Neuronal expression of opioid gene is controlled by dual epigenetic and transcriptional mechanism in human brain. *Cereb. Cortex*. 2018;28(9):3129–3142. DOI: 10.1093/cercor/bhx181.
7. Berrettini W. Alcohol addiction and the mu-opioid receptor. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2016;65:228–233. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2015.07.011.
8. Estave P.M., Spodnick M.B., Karkhanis A.N. KOR control over addiction processing: An exploration of the mesolimbic dopamine pathway. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2022;271:351–377. DOI: 10.1007/164_2020_421.
9. Ford C.P., Mark G.P., Williams J.T. Properties and opioid inhibition of mesolimbic dopamine neurons vary according to target location. *J. Neurosci.* 2006;26(10):2788–2797. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4331-05.2006.
10. Fricker L.D., Margolis E.B., Gomes I., Devi L.A. Five decades of research on opioid peptides: Current knowledge and unanswered questions. *Mol. Pharmacol.* 2020;98(2):96–108. DOI: 10.1124/mol.120.119388.
11. Green A.S., Grahame N.J. Ethanol drinking in rodents: Is free-choice drinking related to the reinforcing effects of ethanol? *Alcohol*. 2008;42(1):1–11. DOI: 10.1016/j.alcohol.2007.10.005.
12. Hao J., Hao W., Liu Z., Shi P. The toggle switch model for gene expression change during the prenatal-to-postnatal transition in mammals. *Mol. Biol. Evol.* 2022;39(3):msac036. DOI: 10.1093/molbev/msac036.
13. Hutsell B.A., Cheng K., Rice K.C., Negus S.S., Banks M.L. Effects of the kappa opioid receptor antagonist nor-binaltorphimine (nor-BNI) on cocaine versus food choice and extended-access cocaine intake in rhesus monkeys. *Addict. Biol.* 2016;21(2):360–373. DOI: 10.1111/adb.12206.
14. Koob G.F. Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder. *Front. Psychiatry*. 2013;4:72. DOI: 10.3389/fpsy.2013.00072.

15. Koob G.F., Volkow N.D. Neurobiology of addiction: A neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry*. 2016;3(8):760–773. DOI: 10.1016/S2215-0366(16)00104-8.
16. Lalanne L., Ayranci G., Kieffer B.L., Lutz P.E. The kappa opioid receptor: From addiction to depression, and back. *Front. Psychiatry*. 2014;5:170. DOI: 10.3389/fpsyt.2014.00170.
17. Laurent V., Leung B., Maidment N., Balleine B.W. μ - and δ -opioid-related processes in the accumbens core and shell differentially mediate the influence of reward-guided and stimulus-guided decisions on choice. *J. Neurosci*. 2012;32(5):1875–1883. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4688-11.2012.
18. Lussier A.A., Morin A.M., MacIsaac J.L., Salmon J., Weinberg J., Reynolds J.N., Pavlidis P, Chudley A.E., Kobor M.S. DNA methylation as a predictor of fetal alcohol spectrum disorder. *Clin. Epigenetics*. 2018;10:5. DOI: 10.1186/s13148-018-0439-6.
19. MacPherson L., Magidson J.F., Reynolds E.K., Kahler C.W., Lejuez C.W. Changes in sensation seeking and risk-taking propensity predict increases in alcohol use among early adolescents. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2010;34(8):1400–1408. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2010.01223.x.
20. Mandal C., Halder D., Jung K.H., Chai Y.G. Gestational alcohol exposure altered DNA methylation status in the developing fetus. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(7):1386. DOI: 10.3390/ijms18071386.
21. Margolis E.B., Lock H., Chefer V.I., Shippenberg T.S., Hjelmstad G.O., Fields H.L. Kappa opioids selectively control dopaminergic neurons projecting to the prefrontal cortex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006;103(8):2938–2942. DOI: 10.1073/pnas.0511159103.
22. Marjonon H., Sierra A., Nyman A., Rogojin V., Grohn O., Linden A.M., Hautaniemi S., Kaminen-Ahola N. Early maternal alcohol consumption alters hippocampal DNA methylation, gene expression and volume in a mouse model. *PLoS One*. 2015;10(5):e0124931. DOI: 10.1371/journal.pone.0124931.
23. McQuire C., Mukherjee R., Hurt L., Higgins A., Greene G., Farewell D., Kemp A., Paranjothy S. Screening prevalence of fetal alcohol spectrum disorders in a region of the United Kingdom: A population-based birth-cohort study. *Prev. Med.* 2019;118:344–351. DOI: 10.1016/j.ypmed.2018.10.013.
24. Miao Z., Li Y., Mao F., Zhang J., Sun Z.S., Wang Y. Prenatal witness stress induces intergenerational anxiety-like behaviors and altered gene expression profiles in male mice. *Neuropharmacology*. 2022;202:108857. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2021.108857.
25. Molina J.C., Spear N.E., Spear L.P., Mennella J.A., Lewis M.J. The International society for developmental psychobiology 39th annual meeting symposium: Alcohol and development: Beyond fetal alcohol syndrome. *Dev. Psychobiol.* 2007;49(3):227–242. DOI: 10.1002/dev.20224.
26. Nizhnikov M.E., Pautassi R.M., Carter J.M., Landin J.D., Varlinskaya E.I., Bordner K.A., Werner D.F., Spear N.E. Brief prenatal ethanol exposure alters behavioral sensitivity to the kappa opioid receptor agonist (U62,066E) and antagonist (Nor-BNI) and reduces kappa opioid receptor expression. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2014;38(6):1630–1638. DOI: 10.1111/acer.12416.
27. Pautassi R.M., Nizhnikov M.E., Acevedo M.B., Spear N.E. Early role of the kappa opioid receptor in ethanol-induced reinforcement. *Physiol. Behav.* 2012;105(5):1231–1241. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.01.003.
28. Popova S., Lange S., Probst C., Gmel G., Rehm J. Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health*. 2017;5(3):e290–e299. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30021-9.
29. Shippenberg T.S., Zapata A., Chefer V.I. Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction. *Pharmacol. Ther.* 2007;116(2):306–321. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.06.011.
30. Spear N.E., Molina J.C. Fetal or infantile exposure to ethanol promotes ethanol ingestion in adolescence and adulthood: A theoretical review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2005;29(6):909–929. DOI: 10.1097/01.alc.0000171046.78556.66.
31. Streissguth A.P., Bookstein F.L., Barr H.M., Sampson P.D., O'Malley K., Young J.K. Risk factors for adverse life outcomes in fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 2004;25(4):228–238. DOI: 10.1097/00004703-200408000-00002.
32. Tejada H.A., Bonci A. Dynorphin/kappa-opioid receptor control of dopamine dynamics: Implications for negative affective states and psychiatric disorders. *Brain Res.* 2019;1713:91–101. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.09.023.
33. Trevisani M., Smart D., Gunthorpe M.J., Tognetto M., Barbieri M., Campi B., Amadesi S., Gray J., Jerman J.C., Brough S.J., Owen D., Smith G.D., Randall A.D., Harrison S., Bianchi A., Davis J.B., Geppetti P. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat. Neurosci.* 2002;5(6):546–551. DOI: 10.1038/nn0602-852.
34. Youngentob S.L., Glendinning J.I. Fetal ethanol exposure increases ethanol intake by making it smell and taste better. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009;106(13):5359–5364. DOI: 10.1073/pnas.0809804106.
35. Youngentob S.L., Kent P.F., Sheeha P.R., Molina J.C., Spear N.E., Youngentob L.M. Experience-induced fetal plasticity: The effect of gestational ethanol exposure on the behavioral and neurophysiological

- olfactory response to ethanol odor in early postnatal and adult rats. *Behav. Neurosci.* 2007;121(6):1293–1305. DOI: 10.1037/0735-7044.121.6.1293.
36. Youngentob S.L., Molina J.C., Spear N.E., Youngentob L.M. The effect of gestational ethanol exposure on voluntary ethanol intake in early postnatal and adult rats. *Behav. Neurosci.* 2007;121(6):1306–1315. DOI: 10.1037/0735-7044.121.6.1306.
37. Zuccarello D., Sorrentino U., Brasson V., Marin L., Piccolo C., Capalbo A., Andrisani A., Cassina M. Epigenetics of pregnancy: Looking beyond the DNA code. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2022;39(4):801–816. DOI: 10.1007/s10815-022-02451-x.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кохан Виктор Сергеевич*, к.б.н., Национальный научный центр наркологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;
e-mail: viktor_kohan@hotmail.com

Анохин Пётр Константинович, к.б.н., Национальный научный центр наркологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;
e-mail: petranokhin@mail.ru

Пахлова Екатерина Павловна, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;
e-mail: kpakhlova@gmail.com

Сарычева Наталия Юрьевна, к.б.н., ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;
e-mail: nsarychava@gmail.com

Шамакина Инна Юрьевна, к.б.н., Национальный научный центр наркологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России;
e-mail: shamakina@yahoo.com

Viktor S. Kokhan*, Cand. Sci. (Biol.), National Scientific Center for Narcology — Branch of the V.P. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: viktor_kohan@hotmail.com

Petr K. Anokhin, Cand. Sci. (Biol.), National Scientific Center for Narcology — Branch of the V.P. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: petranokhin@mail.ru

Ekaterina P. Pakhlova, Lomonosov Moscow State University;
e-mail: kpakhlova@gmail.com

Natalia Yu. Sarycheva, Cand. Sci. (Biol.), Lomonosov Moscow State University;
e-mail: nsarychava@gmail.com

Inna Yu. Shamakina, Cand. Sci. (Biol.), National Scientific Center for Narcology — Branch of the V.P. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: shamakina@yahoo.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Лабораторкорм

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

Реализуем:

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

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



Доставка в любой регион России

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

ООО «Лабораторкорм»

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

www.laboratorkorm.ru

Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России

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

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

Филиал «Столбовая» предлагает следующих животных:

I. Инбредные мыши линий:

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

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

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

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

II. Трансгенные мыши линий:

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

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

III. Межлинейные гибриды мышей:

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

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

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

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

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

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

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



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

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

E-mail: biomaus@mail.ru

