

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

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

# БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

## JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) **19**  
**2023**

# 1



## Уважаемые коллеги!

Приглашаем Вас принять участие в **XIX ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование»**, которая будет проводиться **24–25 мая 2022 г.** в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России по адресу:

**143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1;**  
**тел.: (495) 561-52-64; e-mail: alimkina@scbmt.ru, oga@scbmt.ru**

### Секции Конференции:

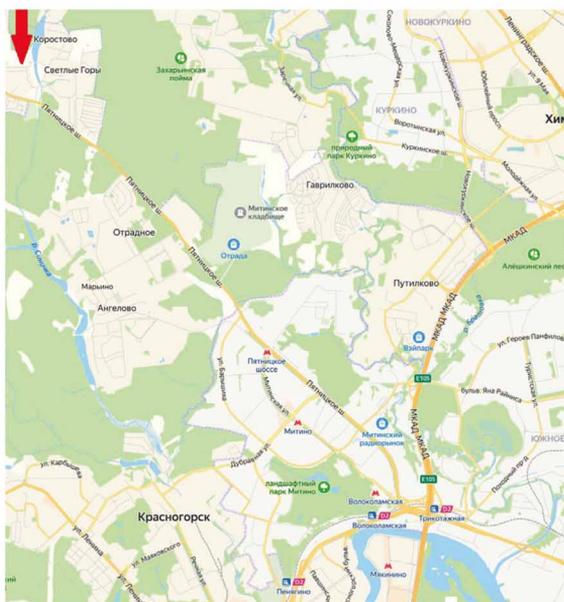
- *Биомоделирование в живых системах;*
- *Методы и технологии биомедицинских исследований;*
- *Доклинические исследования в биомедицине;*
- *Релевантное и альтернативное биомоделирование;*
- *Трансгенез и генномодифицированные животные.*

В рамках конференции предусматривается проведение секций молодых ученых, студентов и школьников.

Участие в конференции предполагается в двух форматах: традиционном и заочном. Лучшие из работ будут опубликованы в журнале «Биомедицина».

Время для доклада на пленарном заседании: 20 мин, на секциях – 10 мин. Возможно представление стендовых докладов.

Материалы на конференцию в виде кратких сообщений, оформленных в соответствии с правилами для авторов, опубликованными на сайте журнала «Биомедицина» (<https://journal.scbmt.ru/jour/about/submissions#authorGuidelines>), с указанием фамилии, имени, отчества (полностью), учреждения и названия доклада предоставляются до **15 апреля 2023 г.**



### СХЕМА ПРОЕЗДА:

Проезд от станции метро «Пятницкое шоссе» на автобусе 575, 32- (прямой), маршрутном такси 164к, 575, 1016, 1212к, «Митино-Брехово» до остановки «Марьино-Знаменское», далее пешком до Центра через посёлок, на автобусе 32 (с заездом в Светлые горы) до остановки «Светлые горы». На автомобиле: по Пятницкому шоссе (6 км от МКАД) до поворота на Светлые горы, мимо пруда до фельдшерского пункта, после него поворот по указателю налево, между двух прудов по дамбе прямо до Центра.

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий  
ФМБА России»

# БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.  
4 выпуска в год

---

2023, Том 19, № 1

---

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

# JOURNAL BIOMED

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.  
Quarterly.

---

2023, Vol. 19, No. 1

---

# 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

<b>История издания журнала:</b>	Журнал издается с 2005 г.
<b>Периодичность:</b>	4 выпуска в год
<b>Префикс DOI:</b>	10.33647
<b>ISSN</b>	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
<b>Свидетельство о регистрации СМИ:</b>	Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати. Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 от 09.06.2005
<b>Индексация:</b>	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
<b>Подписной индекс:</b>	57995 в объединенном каталоге «Пресса России»
<b>Стоимость одного выпуска:</b>	400 руб.
<b>Условия распространения материалов:</b>	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
<b>Учредитель:</b>	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
<b>Издатель:</b>	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
<b>Редакция:</b>	143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1 Тел.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: <a href="mailto:info@scbmt.ru">info@scbmt.ru</a> , <a href="mailto:scbmt@yandex.ru">scbmt@yandex.ru</a>
<b>Тираж:</b>	3000 экземпляров
<b>Типография:</b>	ООО «БЕАН» 603003, Нижегородская обл., Нижний Новгород, ул. Баррикад, д. 1
<b>Дата выхода в свет:</b>	10.03.2023

# 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

<b>Founded:</b>	The journal has been published since 2005.
<b>Frequency:</b>	Quarterly
<b>DOI Prefix:</b>	10.33647
<b>ISSN</b>	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
<b>Mass media registration certificate:</b>	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 of 09.06.2005
<b>Indexing:</b>	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)
<b>Subscription index:</b>	57995 in the combined catalogue "Pressa Rossii"
<b>Price:</b>	400 RUR
<b>Content distribution terms:</b>	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
<b>Founders:</b>	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
<b>Publisher:</b>	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
<b>Editorial office:</b>	143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: <a href="mailto:info@scbmt.ru">info@scbmt.ru</a> , <a href="mailto:scbmt@yandex.ru">scbmt@yandex.ru</a>
<b>Circulation:</b>	3000 copies
<b>Printing house:</b>	BEAN, LLC. 603003, Russian Federation, Nizhny Novgorod Region, Nizhny Novgorod, Barrikad Street, 1
<b>Publication date:</b>	10.03.2023

## ■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- С.Л. Люблинский, И.Н. Люблинская, Е.М. Колоскова, Л.Ф. Керемецкая, А.М. Азизов, В.Н. Каркищенко, М.С. Нестеров, А.В. Капцов, А.В. Шарабанов, Р.А. Агельдинов, В.Н. Герасимов**  
 Опытнo-промышленная технология получения субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, с заданными параметрами стабильности . . . . 8
- В.Н. Коробова, И.И. Бобынцев, А.О. Ворвуль**  
 Особенности вариабельности ритма сердца самцов и самок крыс Wistar . . . . . 22
- А.Б. Салмина, Я.В. Горина, А.В. Большакова, О.Л. Власова**  
 Анализ основных мировых трендов в объективизации протоколов поведенческого тестирования лабораторных животных с патологией головного мозга . . . . . 34

## ■ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

- М.С. Аксёнова, Е.Н. Бочарова, С.Г. Аббасова, А.С. Пономарёв, В.В. Логинова, М.В. Болотникова, Н.В. Бельская, А.А. Казаров, А.Е. Лисова, Н.К. Кудина, М.С. Пантюшенко, М.В. Жилиева, Д.С. Копеин, Ю.М. Карелов, Г.Г. Эрастов, М.В. Лыков, Р.А. Хамитов**  
 Исследование сопоставимости фармакодинамических, токсикологических и фармакокинетических свойств референтного лекарственного препарата Пульмозим и биоаналогичного лекарственного препарата Тигераза . . . . . 47
- Е.А. Киселева, С.Г. Крылова, Т.Н. Поветьева, Ю.В. Нестерова, О.Г. Афанасьева, П.В. Кульпин, Д.А. Кулагина, Е.П. Зуева, Н.И. Суслов, В.В. Еремина, О.В. Байбакова, С.В. Сысолятин, В.В. Жданов**  
 Исследование антиноцицептивной активности новой молекулы из класса гексаазаизовюрцитанов . . . . . 61
- М.В. Савицкий, Н.Е. Москалева, Н.А. Зигангирова, А.В. Соловьева, А.Б. Шерemet, Н.Е. Бондарева, Н.Л. Лубенец, Н.В. Пятигорская, С.А. Апполонова**  
 Экспериментальная фармакокинетика, изучение метаболизма и тканевого распределения нового антивирулентного средства фтортиазинон . . . . . 73
- Н.Ю. Тимофеева, Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко, Н.В. Бубнова, О.Ю. Кострова, И.С. Стоменская, А.А. Котёлкина**  
 Морфофункциональное состояние надпочечников крыс при введении уретана и селена . . . . . 85

## ■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

- Stanislav L. Lyublinskiy, Irina N. Lyublinskaya, Elena M. Koloskova, Larisa F. Keremetskaya, Arif M. Azizov, Vladislav N. Karkischenko, Maksim S. Nesterov, Alexander V. Kaptsov, Andrey V. Sharabanov, Ruslan A. Ageldinov, Vladimir N. Gerasimov**  
 Pilot-Scale Technology for Obtaining a Substance of Lipid-Stabilized Nanoparticles Containing a Complex of Biologically Active Substances Isolated from Gland Secretion of Musk Deer with Specified Stability Parameters . . . . . 8
- Victoria N. Korobova, Igor I. Bobyntsev, Anton O. Vorvul**  
 Features of Heart Rate Variability in Male and Female Wistar Rats . . . . . 22
- Alla B. Salmina, Yana V. Gorina, Anastasia V. Bolshakova, Olga L. Vlasova**  
 Analysis of Main World Trends in Objectivization of Protocols for Behavioral Testing of Laboratory Animals with Brain Pathology. . . . . 34

## ■ PRECLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE

- Maria S. Aksenova, Eugenia N. Bocharova, Svetlana G. Abbasova, Alexander S. Ponomarev, Valentina V. Loginova, Maria V. Bolotnikova, Nataliya V. Belskaya, Aleksander A. Kazarov, Alena E. Lisova, Nataliya K. Kudina, Marina S. Pantyushenko, Maria V. Zhilyaeva, Damir S. Kopein, Yuri M. Karelov, Georgiy G. Erastov, Maksim V. Lykov, Ravil A. Chamitov**  
 Comparability of the Reference Drug Pulmozim and a Similar Drug Tigerase in Terms of their Pharmacodynamic, Toxicological and Pharmacokinetic Properties . . . . . 47
- Elena A. Kiseleva, Svetlana G. Krylova, Tatyana N. Povet`eva, Yuliya V. Nesterova, Olga G. Afanas`eva, Pavel V. Kul`pin, Daria A. Kulagina, Elena P. Zueva, Nikolay I. Suslov, Valeria V. Eremina, Olga V. Baibakova, Sergey V. Sysolyatin, Vadim V. Zhdanov**  
 Study into Antinociceptive Activity of a New Molecule from the Class of Hexaazaizowurzitane. . . . . 61
- Mark V. Savitskii, Natalia E. Moskaleva, Nailya A. Zigangirova, Anna V. Soloveva, Anna B. Sheremet, Natalia E. Bondareva, Nadezhda L. Lubenec, Natalia V. Pyatigorskaya, Svetlana A. Appolonova**  
 Experimental Pharmacokinetics, Metabolism and Tissue Distribution Studies of Fluorothiazinon, a Novel Antivirulence Drug. . . . . 73
- Natalia Yu. Timofeeva, Larisa M. Merkulova, Gleb Yu. Struchko, Natalia V. Bubnova, Olga Yu. Kostrova, Irina S. Stomenskaya, Anastasiia A. Kotelkina**  
 Morphofunctional State of the Adrenal Glands in Rats under Urethane and Selenium Administration. . . . . 85



## ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СУБСТАНЦИИ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ В ЛИПИДАХ УСТОЙЧИВЫХ НАНОЧАСТИЦ, СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКС БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МУСКУСА КАБАРГИ, С ЗАДАНЫМИ ПАРАМЕТРАМИ СТАБИЛЬНОСТИ

С.Л. Люблинский<sup>1</sup>, И.Н. Люблинская<sup>2,\*</sup>, Е.М. Колоскова<sup>2</sup>, Л.Ф. Керемецкая<sup>2</sup>,  
А.М. Азизов<sup>2</sup>, В.Н. Каркищенко<sup>1</sup>, М.С. Нестеров<sup>1</sup>, А.В. Капцов<sup>1</sup>, А.В. Шарабанов<sup>1</sup>,  
Р.А. Агельдинов<sup>1,3</sup>, В.Н. Герасимов<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup> ООО «Научно-производственная фирма «МОБИТЕК-М»»  
249010, Российская Федерация, Калужская область, Боровск, п. Институт, 6

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»  
125047, Российская Федерация, Москва, Миусская пл., 9

<sup>4</sup> ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»  
142279, Российская Федерация, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

В ходе усовершенствования опытно-промышленной технологии производства липосомированной субстанции биологически активных веществ (БАВ) из мускуса кабарги установлены режимы, обеспечивающие получение липосом в соответствии с правилами GMP с заданными параметрами стабильности (форма, гидродинамический диаметр, заряд, индекс полидисперсности) и максимальное включение БАВ из мускуса кабарги в липосомы с сохранением исходной биологической активности важнейших его компонентов, а также в два раза сокращающие продолжительность технологического цикла производства субстанции с выходом конечного продукта более 90%.

Усовершенствованная технология обеспечивает получение не менее 80% липосом с оптимальным для трансмукозального способа доставки лекарственных веществ размером основной фракции липосом в опытных образцах в диапазоне 200±50 нм — для конечной субстанции (до лиофилизации), и 250±100 нм — после её восстановления (регидратации), индексом полидисперсности менее 0,3 и дзета-потенциалом — менее -35 мВ.

Показатели качества, характеризующие дисперсность полученной липосомальной субстанции, исследованы соответствующими методами анализа (динамическое светорассеяние, электронная микроскопия). На основании полученных результатов доработан проект спецификации на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги.

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

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Люблинский С.Л., Люблинская И.Н., Колоскова Е.М., Керемецкая Л.Ф., Азизов А.М., Каркищенко В.Н., Нестеров М.С., Капцов А.В., Шарабанов А.В., Агельдинов Р.А., Герасимов В.Н. Опытная-промышленная технология получения субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги, с заданными параметрами стабильности. *Биомедицина*. 2023;19(1):8–21. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-8-21>

Поступила 01.09.2022

Принята после доработки 15.12.2022

Опубликована 10.03.2023

## PILOT-SCALE TECHNOLOGY FOR OBTAINING A SUBSTANCE OF LIPID-STABILIZED NANOPARTICLES CONTAINING A COMPLEX OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ISOLATED FROM GLAND SECRETION OF MUSK DEER WITH SPECIFIED STABILITY PARAMETERS

Stanislav L. Lyublinskiy<sup>1</sup>, Irina N. Lyublinskaya<sup>2\*</sup>, Elena M. Koloskova<sup>2</sup>, Larisa F. Keremetskaya<sup>2</sup>, Arif M. Azizov<sup>2</sup>, Vladislav N. Karkischenko<sup>1</sup>, Maksim S. Nesterov<sup>1</sup>, Alexander V. Kaptsov<sup>1</sup>, Andrey V. Sharabanov<sup>1</sup>, Ruslan A. Ageldinov<sup>1,3</sup>, Vladimir N. Gerasimov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> Scientific-Production Firm "MOBITEK-M"  
249010, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institute Village, 6

<sup>3</sup> D.I. Mendeleev Russian Chemical Technology University  
125047, Russian Federation, Moscow, Miuskaya Square, 9

<sup>4</sup> State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District, Obolensk Village

In the course of improving the pilot-scale technology for manufacturing a liposomal substance of biologically active substances (BAS) isolated from the gland secretion of musk deer, the authors established operations and modes to ensure the production of liposomes with the specified stability parameters (shape, hydrodynamic diameter, charge, and polydispersity index) in full compliance with GMP requirements and the maximum inclusion of BAS from deer musk into liposomes with the preservation of the initial biological activity of its most important components. The established modes provide for a two-fold reduction in the technological cycle duration with the substance yield of more than 90%. The improved technology ensures the production of at least 80% of liposomes with the main liposome fraction in experimental samples in the range of 200+50 nm and 250+100 nm for the final substance (before lyophilization) and after its recovery (rehydration), respectively, which is considered optimal for transmucosal drug administration. The polydispersity index was less than 0.3, and the zeta (Z)-potential was less than -35 mV. The quality indicators characterizing the dispersity of the resulting liposomal substance were studied by conventional analytical methods (dynamic light scattering, electron microscopy). On the basis of the obtained results, a draft specification for a liposomal substance (powder) containing a complex of BAS isolated from deer musk was finalized.

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

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

**For citation:** Lyublinskiy S.L., Lyublinskaya I.N., Koloskova E.M., Keremetskaya L.F., Azizov A.M., Karkischenko V.N., Nesterov M.S., Kaptsov A.V., Sharabanov A.V., Ageldinov R.A., Gerasimov V.N. Pilot-Scale Technology for Obtaining a Substance of Lipid-Stabilized Nanoparticles Containing a Complex of Biologically Active Substances Isolated from Gland Secretion of Musk Deer with Specified Stability Parameters. *Journal Biomed.* 2023;19(1):8–21. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-8-21>

Submitted 01.09.2022

Revised 15.12.2022

Published 10.03.2023

## Введение

В настоящее время установлены основные критические точки и их параметры для процесса производства липосомальных препаратов, подлежащие тщательному контролю в соответствии с ОФС 1.1.0006.15 «Фармацевтические субстанции». Однако при разработке данных технологий известны многочисленные случаи, когда эффективные и безопасные липосомальные препараты, полученные в лабораторных условиях, не всегда удавалось воспроизвести в условиях промышленного производства.

Это связано с множеством различных факторов — составом инкапсулированного лекарственного вещества, неоднородностью липидных компонентов, применяемых для формирования бислоя везикул, экспозицией биохимически важных функциональных групп на наружной поверхности липосом, фиксированной толщиной водного слоя, числом липидных бислоев и т. д., а также во многом зависит от используемого технологического оборудования и масштаба производства.

Разработанная технология должна отличаться простотой способа получения липосом, нужной производительностью и наличием стандартного промышленного оборудования, а также обеспечивать необходимые параметры дисперсий, определяющих высокую стабильность получаемых липосом. Из известных технологий получения липосом [7] был выбран, как наиболее производительный и легко масштабируемый, способ гомогенизации под высоким давлением [9].

При совершенствовании опытно-промышленной технологии получения субстанции липосом, содержащих биологически активные вещества (БАВ) из мускуса кабарги, учитывался тот факт, что в последующем данную субстанцию планируется применять для производства пероральных препаратов трансмукозального введения

[8]. Это позволяет использовать меньшее количество действующего вещества при одной и той же его биодоступности.

В связи с этим усовершенствованная технология должна обеспечивать получение не менее 80% липосом с оптимальным для данного способа доставки лекарственного вещества (ЛВ) размером основной фракции липосом в опытных образцах в диапазоне  $200 \pm 50$  нм — для исходной субстанции (до лиофилизации), и  $250 \pm 100$  нм — после её восстановления (регидратации), индексом полидисперсности менее 0,3 и дзета-потенциалом — менее  $-35$  мВ.

**Целью** настоящей работы являлось усовершенствование опытно-промышленной технологии для получения стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц с заданными основными параметрами дисперсности методом гомогенизации под высоким давлением.

## Материалы и методы

Для получения липосомальной субстанции в ходе работы в качестве сырья были использованы сухой концентрат БАВ из мускуса кабарги [5] и 70% фосфатидилхолин (ФХ) отечественного производства [6].

Технологический процесс получения липосом осуществляли при помощи последней модификации отечественного гомогенизатора высокого давления «Донор-5» [4], превосходящего по своим технологическим характеристикам все серийно выпускаемые в настоящее время отечественные и зарубежные аналоги.

Оценку подлинности и верификацию липосомированной формы проводили в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (г. Оболенск) методом негативного контрастирования в трансмиссионном электронном микроскопе Tecnaï G2 Spirit bioTWIN («FEI», США) при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличениях до 80 000 крат.

Для определения размерного распределения липосом, индекса полидисперсности и дзета-потенциала использовался метод динамического рассеяния света (ДРС) с помощью лазерного корреляционного спектрометра Photocor Compact [4].

Индекс окисленности липидов в составе липосом определялся фотометрическим методом при 232 нм. Определение БАВ из мускуса кабарги и процента их включения в липосомы проводилось методом ВЭЖХ, разработанным ФГБУН НЦБМТ ФМБА России [2, 4].

## Результаты и их обсуждение

Получение липосомальной субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги, осуществляли по разработанной технологической схеме (рис. 1).

В ходе усовершенствования опытно-промышленной технологии производства липосом, содержащих БАВ из мускуса кабарги, использовались не только зарубежные и отечественные информационные материалы, но и собственный практический опыт [4], а также технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов в условиях GMP [3].

Для выработки липосом предварительно готовили р-ры концентрата БАВ из мускуса кабарги, ФХ и трегалозы с применением буферного р-ра на основе 0,9% р-ра хлорида натрия с  $pH=7,5\pm 0,5$ .

Подготовленные р-ры БАВ мускуса и ФХ объединяли и диспергировали до образования гомогенной дисперсии при помощи гомогенизатора-диспергатора при скорости 10 000 об./мин.

В полученную 20% (из расчёта на ФХ) липосомальную преддисперсию добавляли трегалозу и обрабатывали с помощью гомогенизатора высокого давления, постепенно поднимая давление от 20 до 40 МПа, постоянно контролируя процесс с помо-

щью лазерного анализатора размера частиц «Photocor Mini». При достижении частицами среднего размера  $200\pm 50$  нм (не менее 80% от их общего количества) добавляли остаток буферного р-ра, содержащего трегалозу, и проводили гомогенизацию 10% липосомальной дисперсии при давлении 40 МПа.

Электронно-микроскопические исследования структуры конечной 10% дисперсии липосом до лиофильной сушки показали, что липосомы в опытных образцах представляют собой везикулы регулярной округлой и овальной формы диаметром от 50 до 250 нм (рис. 2). При этом липосомы диаметром от 50 до 200 нм составляют более 80% от всех липосомальных частиц в образце. Во внутренней структуре липосом отчётливо видны мелкие образования нерегулярной формы с разной электронно-оптической плотностью диаметром 5–20 нм, предположительно — частицы БАВ из мускуса кабарги.

В ходе технологического процесса контролировалось уменьшение размера и распределение везикул (рис. 3). Следует отметить, что значение «mean» в таблице соответствует радиусу измеряемой липосомы. Для получения величины гидродинамического диаметра везикулы полученный результат необходимо умножить на два.

Эти результаты подтверждают исследование липосомальной дисперсии с помощью электронной микроскопии. Приведённые в качестве примера данные на рис. 3 показывают, что в полученной липосомальной дисперсии мускуса кабарги 92,6% составляют везикулы с размером  $198\pm 46$  нм. Это полностью соответствует заданному при производстве опытных партий субстанции параметру, в соответствии с которым не менее 80% частиц конечной липосомальной дисперсии должны иметь размер  $200\pm 50$  нм.

Известно, что главным препятствием для применения липосом в медицинской практике является их неустойчивость в про-

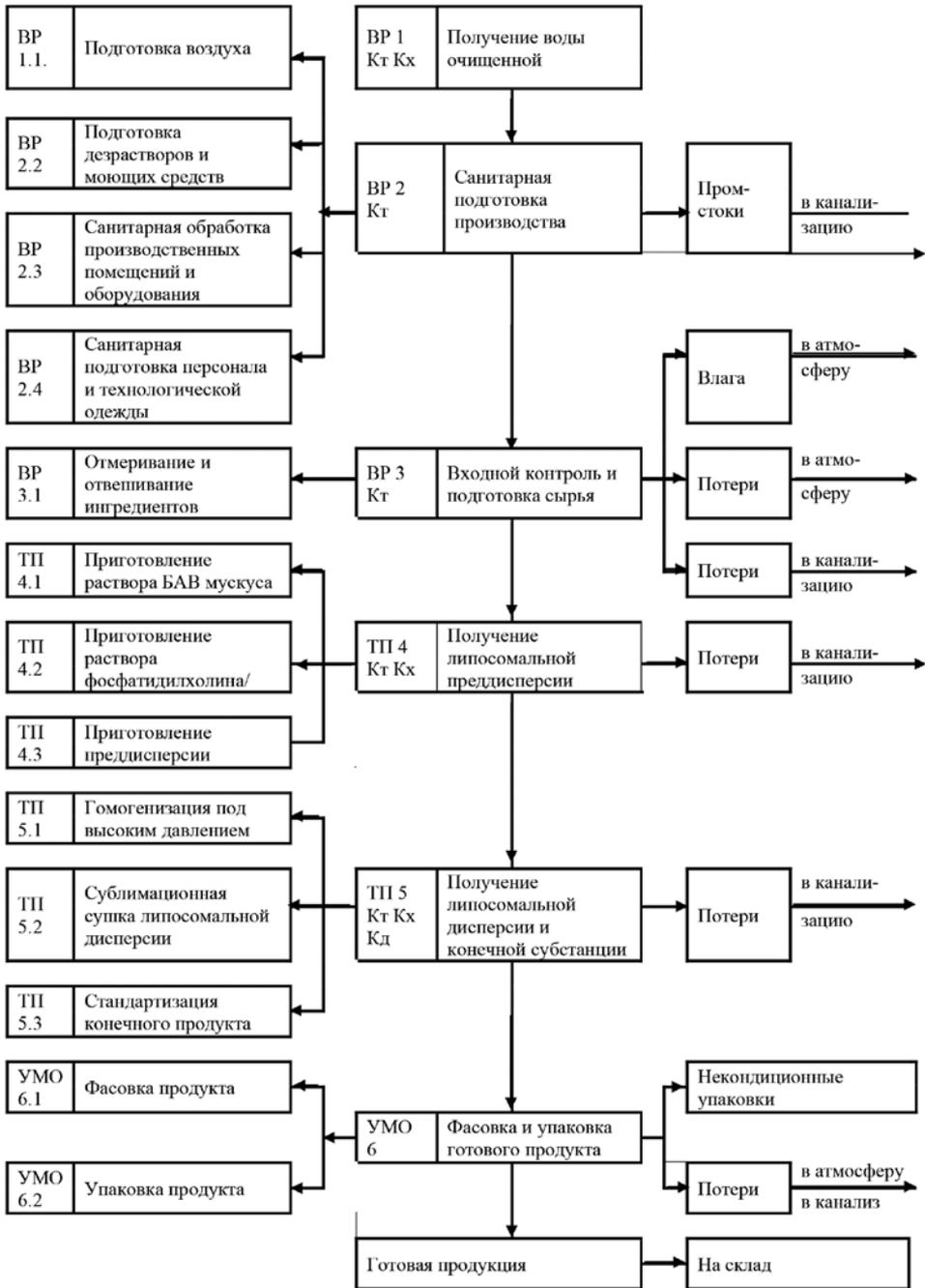
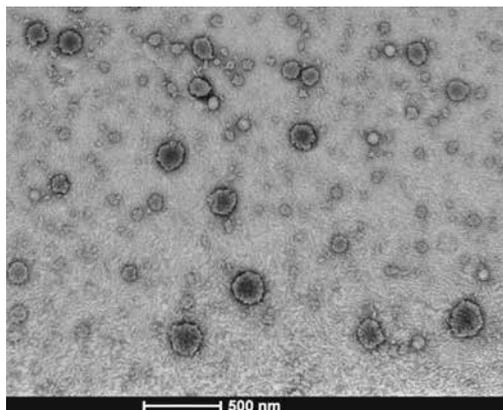


Рис. 1. Схема производства липосомальной субстанции БАВ из мускуса.  
 Fig. 1. Production scheme of a BAS liposomal substance from deer musk.



**Рис. 2.** Микрофотография липосом в конечной 10% липосомальной дисперсии.

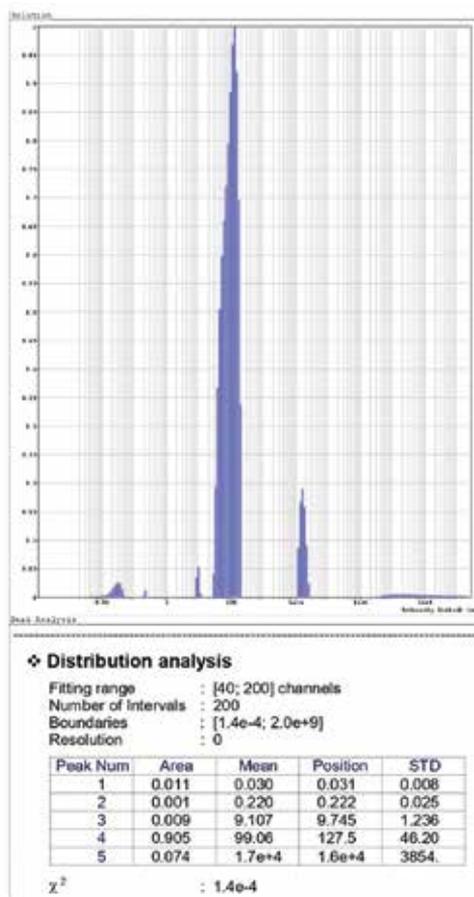
**Fig. 2.** Micrograph of liposomes in the final 10% liposomal dispersion.

цессе производства и хранения. Это явление тесно связано с технологией получения липосом и их компонентным составом. Анализ данных факторов позволил оптимизировать соотношения различных по своей природе БАВ из мускуса кабарги, ФХ и других вспомогательных веществ, которые являются структурными компонентами липосом, а также основные режимы получения субстанции липосом с заданным размером и зарядом.

В ходе выполнения исследований установлено положительное влияние увеличения концентрации ФХ с 10 до 20% при получении липосомальной преддисперсии (рис. 1, ТП 4) с последующим постепенным её снижением до 10% при производстве липосомальной дисперсии (рис. 1, ТП 5) на размер и распределение липосом, а также степень включения в них БАВ.

Этот факт объясняется не только тем, что в два раза увеличилось количество везикул в дисперсии, но и тем, что усилилось взаимодействие ФХ липидного бислоя полученных липосом и холестерина, входящего в состав БАВ из мускуса кабарги.

Взаимодействие холестерина с метильными группами холина и С=О/Р=О группами в ФХ приводит к увеличению прочности



**Рис. 3.** Среднее интегральное значение размера частиц конечной 10% липосомальной дисперсии мускуса кабарги при давлении 40 МПа.

**Fig. 3.** Average integral value of the particle size of the final 10% liposomal dispersion of deer musk at a pressure of 40 MPa.

липосом, снижению скорости вытекания из них содержимого и увеличению процента включения БАВ за счёт ослабления связи между ацильными цепями фосфолипидов и повышения температуры их фазового перехода (Т°ф.п.). Известно, что липосомы, не содержащие холестерина, подвержены большей деградации при длительном хранении.

Дополнительным фактором, способствующим увеличению дзета-потенциала — отрицательного заряда липосом (до -50 мВ

и более) — и стабильности, явилась замена дистиллированной воды, используемой в технологическом процессе, на 0,9% р-р хлорида натрия.

После гомогенизации полученную липосомальную дисперсию равномерно разливали в лотки, замораживали в течение не менее 24 ч при температуре  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  и проводили лиофилизацию опытных образцов в течение 30 ч, постепенно поднимая температуру продукта от  $-40$  до  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Необходимо отметить, что лиофилизация в неоптимальных режимах и без специальных защитных веществ — криопротекторов — часто приводит к разрушению бислоевой мембраны липосом, их слиянию и агрегации, а также вытеканию включённого водорастворимого ЛВ. Это происходит, когда липидная мембрана достигает  $T^{\circ}\text{ф.п.}$ , и инкапсулированное ЛВ легко высвобождается из липосом при переходе из гелевой фазы в жидкокристаллическую.

Криопротектор, предотвращая фазовый переход, защищает липосомы от повреждения кристаллами льда при замораживании, а также ингибирует их слияние и агрегацию. Криопротекторы способны обеспечивать протективный эффект благодаря двум механизмам: первый связан с замещением воды, второй — с образованием матрицы.

Из всех изученных криопротекторов наиболее эффективными для лиофилизации липосом являются дисахариды глюкозы — сахароза и трегалоза. Благодаря оптимальной температуре образования матрицы ( $T^{\circ}\text{м}$ ) трегалозы ( $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и сахарозы ( $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) они обеспечивают сохранение проницаемости липосомальной мембраны, а также препятствуют вытеканию содержимого везикул при лиофилизации. Для эффективной защиты криопротектор должен находиться и внутри, и снаружи липосом, а концентрации его и включённого вещества должны быть подобраны таким образом, чтобы обеспечить оптимальную осмолярность интра-/экстралипосомального пространства.

Добавление трегалозы в установленных соотношениях в водную фазу липосомальной дисперсии (внутри и снаружи) перед замораживанием с последующей сублимацией (рис. 1, ТП 4.3 и ТП 5.1) позволяет предупредить фазовое разделение липидной композиции и вытекание инкапсулированных БАВ, а также сохранить высокую способность липосом к регидратации. Применение трегалозы приводит к формированию многочисленных гидратных форм, изолирующих воду и обеспечивающих тем самым сохранение высокой  $T^{\circ}\text{м}$ . Медленное охлаждение (не более  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) в её присутствии способствует более высокому уровню включения БАВ из мускуса кабарги в липосомы и улучшает их последующую регидратацию.

В настоящее время, в результате большого количества исследований [1], рекомендованы следующие режимы сублимации липосомальных лекарственных форм: время сублимации — от 90 до 100 ч; время предварительного замораживания — от 48 до 56 ч (температура замораживания от  $-50$  до  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); период постоянной скорости в течение 40–50 ч (подъём температуры препарата от  $-45$  до  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); период падающей скорости в течение 40–50 ч (температура изменяется от  $-25$  до  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Применение общих принципов лиофилизации липосом и проведённые исследования по оптимизации режимов позволили подобрать индивидуальный режим лиофилизации липосом (рис. 1, ТП 5.2), содержащих БАВ из мускуса кабарги, в соответствии с их особенностями. В ходе исследований установлен оптимальный уровень жидкой лиофилизируемой субстанции при загрузке в лотки, который не должен превышать 5 мм.

Определено, что длительность этапа предварительного замораживания должна составлять 20–30 ч, из них выдержка («закаливание») при  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  — не менее 18 ч. В начале сублимации до включения нагрева

полок после достижения субстанции температуры  $-50 \pm 2$  °С её выдерживают не менее 2 ч при температуре сублиматора ниже  $-60$  °С и давлении (вакууме) в камере менее 10 Па (1 мм рт. ст.).

Важно, что действие криопротектора на этапе первичной сушки проявляется, когда продукт содержит менее 20% воды. Содержание воды влияет и на включение ЛВ, т. к. остаточная вода является причиной снижения температуры образования матрицы ( $T^m$ ). Известно, что  $T^m$  трегалозы составляет  $-99,7$  и  $-40,3$  °С при остаточном содержании воды менее 0,5 и 6,5% соответственно. Особенностью процесса первичной сушки (сублимации) разработанной субстанции является удаление не менее 80% влаги при постепенном нагреве полок от  $-40$  до  $-20$  °С с шагом 5 °С.

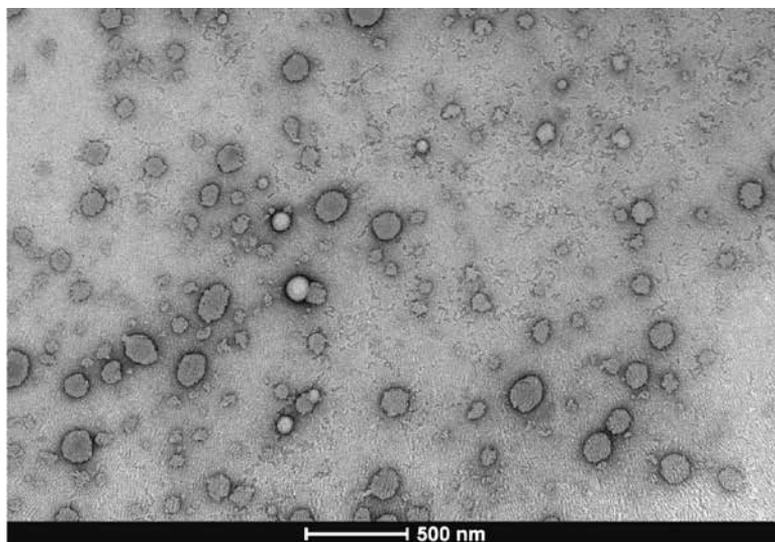
На этапе вторичной сушки (десорбции) температуру повышают до  $+25$  °С. После достижения субстанцией температуры  $+20$  °С её выдерживают при этой температуре в течение 1 ч, затем при  $+25$  °С — 30 мин. При таком режиме лиофилизации размер липосом и включение БАВ мускуса кабар-

ги изменяются незначительно, а остаточная влажность находится на уровне 1–2%. Обязательной является также рекомендация по поддержанию в помещении при выгрузке и последующей расфасовке субстанции в герметичную упаковку температуры  $+25$  °С и влажности менее 40%.

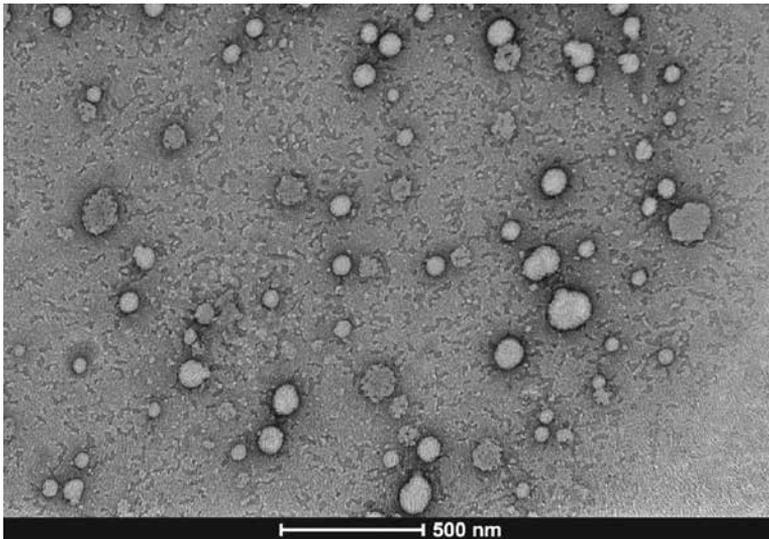
Разработанный алгоритм лиофилизации значительно повышает не только качество и стабильность липосом, но и экономическую эффективность производственного процесса в целом. Изученные режимы лиофилизации субстанции липосом (рис. 1, ТП 5.2) сокращают процесс в более чем в два раза по сравнению с рекомендованным в существующей производственной практике.

Основываясь на полученных результатах, в ходе усовершенствования технологии были наработаны три опытных серии субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих БАВ из мускуса кабарги, с использованием ФХ отечественного производства.

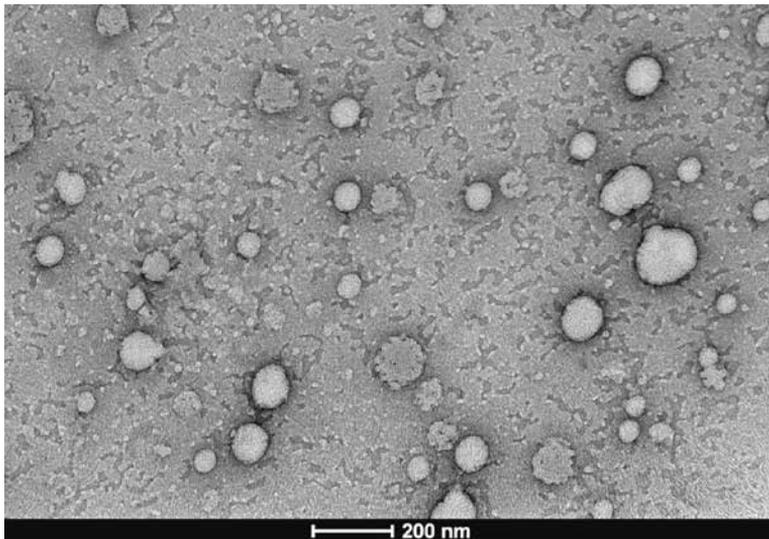
На микрофотографиях (рис. 4–6) представлены данные о морфологии и размере частиц трёх восстановленных липосомальных



**Рис. 4.** Микрофотография липосомальной дисперсии, полученной после регидратации субстанции (образец № 1).  
**Fig. 4.** Micrograph of a liposomal dispersion obtained after the substance rehydration (sample No. 1).



**Рис. 5.** Микрофотография липосомальной дисперсии, полученной после регидратации субстанции (образец № 2).  
**Fig. 5.** Micrograph of a liposomal dispersion obtained after the substance rehydration (sample No. 2).



**Рис. 6.** Микрофотография липосомальной дисперсии, полученной после регидратации субстанции (образец № 3).  
**Fig. 6.** Micrograph of a liposomal dispersion obtained after the substance rehydration (sample No. 3).

образцов мускуса. На них чётко видны отдельные мономеллярные липосомы сферической формы. Липосомы размером от 100 до 250 нм хорошо окрашены гидрофильными (внутренний объём везикул) и гидрофобными (пространство внутри

бислоя везикул, образованного фосфолипидами) компонентами, входящими в состав мускуса кабарги. Важно подчеркнуть, что эти данные хорошо коррелируют с результатами, полученными с помощью анализатора размеров частиц (табл. 1).

**Таблица 1.** Показатели качества опытных образцов липосомированной субстанции мускуса  
**Table 1.** Quality indicators of the prototypes of liposomal musk substance

Показатели	Норма	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Среднее значение
Средний размер везикул, нм	50–500	206±54	268±60	214±43	229±52
Размер частиц менее 250 нм, %	80	89	92	100	94
Индекс полидисперсности	не более 0,5	0,279	0,199	0,161	0,213
Дзета-потенциал, мВ	–25+–55	–52,7±8,3	–42,0±1,0	–36,3±1,0	–43,7±3,4
Индекс окисленности	не более 0,5	0,31	0,30	0,32	0,31

Электронно-микроскопические изображения свидетельствуют о том, что все образцы разработанной липосомальной субстанции после лиофильной сушки и регидратации сохраняют свою первоначальную тонкую структуру и морфометрические параметры.

Известно, что на стадии разработки и получения липосомальной лекарственной формы особое значение представляет характеристика и оценка устойчивости полученного продукта по трём основным показателям — размеру везикул, индексу полидисперсности и дзета-потенциалу.

Размер липосом применяется как основной показатель качества, определяющий стабильность производимой субстанции и её биодоступность. Проведённые исследования размеров везикул в опытных сериях субстанции после регидратации показали незначительное их увеличение по сравнению с исходной липосомальной дисперсией (до лиофилизации) с 200 до 229 нм, что составляет всего 13%. При этом следует отметить, что почти все 100% липосом находятся в заданном в технологическом процессе диапазоне, а именно 250±100 нм (рис. 7), из них везикулы с гидродинамическим диаметром менее 250 нм составляют 94%.

При совершенствовании технологии получения липосом были проведены исследования распределения частиц по их параметрам, а именно диапазон распределения частиц по размерам, который характеризуют по индексу полидисперсности (polydispersity index, PDI). В полученных опытных образцах данный показатель качества зна-

чительно ниже значения PDI для монодисперсных систем, равного 0,5, и составляет в среднем 0,213, что свидетельствует об их высокой гомогенности (табл. 1).

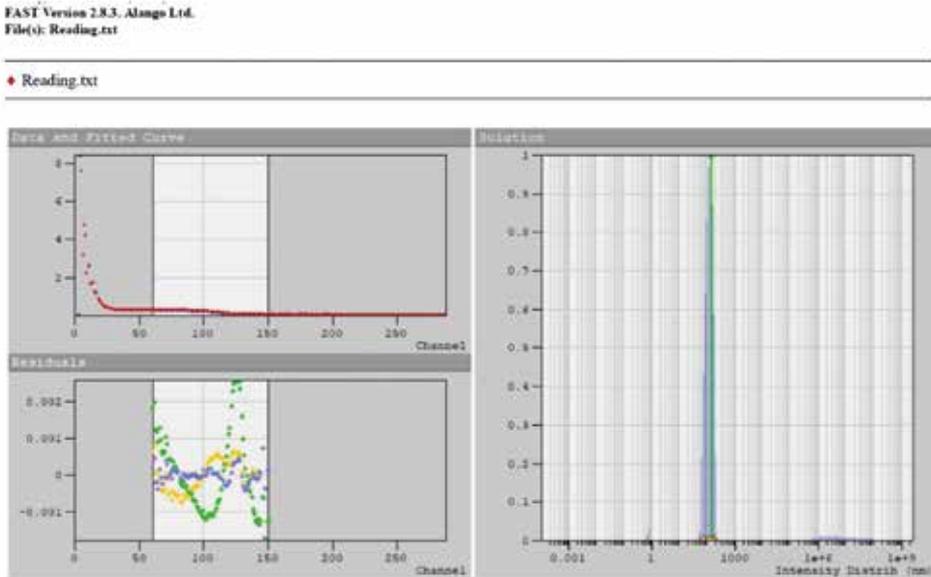
В процессе исследований большое внимание уделялось также дзета-потенциалу, который является важнейшим индикатором поверхностного заряда липосом и мерой их электростатического взаимодействия (отталкивания или притяжения). Липосомы с высоким отрицательным или положительным дзета-потенциалом отталкиваются друг от друга и остаются монодисперсными и стабильными.

Описанные выше дополнительные технологические приёмы позволили оптимизировать этот показатель, который составил в среднем –43,7 мВ (табл. 1). Такое значение дзета-потенциала обеспечивает не только получение стабильной липосомальной субстанции в исходном состоянии, но и высокие показатели качества после её регидратации.

Средний индекс окисленности опытных образцов составил 0,31, что также существенно лучше нормируемого показателя (не более 0,5).

Изучение других параметров, характеризующих качество липосомальной субстанции (подлинность, процент включения БАВ, количественное определение), было проведено в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России и показало, что все опытные образцы соответствуют необходимым требованиям.

Следует подчеркнуть, что показатели микробиологической чистоты, в т. ч. общая обсеменённость (КМАФАнМ), которая со-



*Рис. 7. Пример изученных физических показателей везикул (образец № 3, серия 180522) восстановленной липосомальной дисперсии мускуса кабарги.*

*Fig. 7. An example of the studied physical parameters of vesicles (sample No. 3, series 180522) of the restored liposomal dispersion of deer musk.*

гласно ГФ РФ ОФС 1.2.4.0002.15 (категория 3.2) для этой группы препаратов должна быть не более 1000 КОЕ/г, во всех опытных образцах практически равны нулю.

Полученные результаты позволили уточнить показатели качества и безопасности для разработанной субстанции (табл. 2).

## Выводы

1. В ходе совершенствования опытно-промышленной технологии производства липосомированной субстанции БАВ из мускуса кабарги установлены режимы, обеспечивающие получение липосом с заданными параметрами дисперсности (форма, гидродинамический диаметр, заряд, индекс полидисперсности и т. д.), а также максимальное

включение БАВ в липосомы с сохранением их исходной биологической активности.

2. Определены важнейшие контрольные точки производства, обеспечивающие соблюдение установленного технологического режима в соответствии с правилами GMP, а также основные параметры и требования при загрузке сырья, вспомогательных компонентов и отдельных технологических операций.

3. Усовершенствованные режимы в два раза сокращают процесс лиофилизации субстанции липосом по сравнению с рекомендованным в существующей практике и весь процесс производства субстанции в целом с выходом конечного продукта более 90%.

**Таблица 2.** Проект спецификации на липосомальную субстанцию (порошок), содержащую комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги

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

Показатель	Метод	Норма
Описание	Органолептический ГФ XIII, ОФС 1.1.0006.15, ч. 1	Лиофилизированный аморфный порошок светло-коричневого цвета с характерным запахом и вкусом мускуса
Растворимость	ГФ РФ XIII, ОФС 1.2.1.0005.15, ч. 1, с. 531	Мало растворим в воде, мало растворим в 96% спирте, практически не растворим в гексане
Подлинность: - присутствие липосом; - наличие БАВ мускуса	Электронная микроскопия (метод негативного контрастирования)  ГХ-МС (ГХ-ПИД)  ВЭЖХ-УФ	Моноламеллярные липосомы сферической формы  Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца липосом мускуса кабарги  Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца липосом мускуса кабарги
Размер частиц	ГФ XII, ч. 2 Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	50–500 нм
Индекс полидисперсности	Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	Не более 0,5
Дзета-потенциал	Динамическое светорассеяние	–25±–60 мВ
Степень включения БАВ мускуса	Гель – хроматография ВЭЖХ-МС	Не менее 50% Не менее 50%
Индекс окисленности	Спектрофотометрия	Не более 0,5
pH	ГФ РФ, ОФС 1.1.0006.15 (потенциометрический метод)	От 6,0 до 8,0 (1% раствор)
Вода	ГФ РФ, ОФС 1.2.3.0002.15	Не более 5,0%
Общий белок (растворимая фракция)	ГФ РФ, ОФС 1.2.3.0012.15 Метод Бредфорд (колориметрический)	Не более 4,0%
Сульфатная зола	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0014.15	Не более 10,0%
Тяжёлые металлы	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0012.15	Не более 0,002%
Остаточные органические растворители	ГХ РФ	Этанола — не более 0,5%, изопропилового спирта — не более 0,5%
Микробиологическая чистота	ГФ РФ, ОФС 1.2.4.0002.15	Категория 3.2
Количественное определение	ВЭЖХ	Не менее 90,0% и не более 110,0% в пересчёте на безводное вещество
Хранение	В сухом защищённом от света месте при температуре не выше 20 °С	
Срок годности	Устанавливается	

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Аршинова О.Ю., Санарова Е.В., Ланцова А.В., Оборотова Н.А. Особенности лиофилизации липосомальных лекарственных препаратов (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2012;46(4):29–34. [Arshinova O.Yu., Sanarova Ye.V., Lantsova A.V., Oborotova N.A. Osobennosti liofilizatsii liposomal'nykh lekarstvennykh preparatov (obzor) [Features of lyophilization of liposomal drugs (review)]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal [Chemical-Pharmaceutical Journal]*. 2012;46(4):29–34. (In Russian)].
2. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л. Протеомный анализ в идентификации белковых компонентов препуциальной железы кабарги сибирской. *Биомедицина*. 2019;15(1):35–47. [Karkishchenko V.N., Dulya M.S., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L. Proteomnyy analiz v identifikatsii belkovykh komponentov preputsal'noy zhelezy kabargi sibirskoy [Proteomic analysis in the identification of active components in the preputial gland secretion of the Siberian musk deer]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(1):35–47. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-1-35-47.
3. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов в условиях GMP. *Биофармацевтический журнал*. 2009;1(3):18–29. [Krasnopol'skiy Yu.M., Stepanov A.Ye., Shvets V.I. Tekhnologicheskiye aspekty polucheniya liposomal'nykh preparatov v usloviyakh GMP [Technological aspects of obtaining liposomal preparations under GMP conditions]. *Biofarmatsevticheskii zhurnal [Russian Journal of Biopharmaceuticals]*. 2009;1(3):18–29. (In Russian)].
4. Люблинский С.Л., Люблинская И.Н., Колоскова Е.Н., Азизов А.М., Каркищенко В.Н., Нестеров М.С., Капцов А.В., Агельдинов Р.А., Герасимов В.Н., Гриненко Д.В. Технологические аспекты получения субстанции стабилизированных в липидах устойчивых наночастиц, содержащих комплекс биологически активных веществ, выделенных из мускуса кабарги. *Биомедицина*. 2021;17(4):18–37. [Lyublinskiy S.L., Lyublinskaya I.N., Koloskova E.N., Azizov A.M., Karkishchenko V.N., Nesterov M.S., Kaptsov A.V., Agel'dinov R.A., Gerasimov V.N., Grinenko D.V. Tekhnologicheskiye aspekty polucheniya substantsii stabilizirovannykh v lipidakh ustoychivyykh nanochastits, soderzhashchikh kompleks biologicheskii aktivnykh veshchestv, vydelennykh iz muskusa kabargi [Technological aspects of obtaining liposomes containing of a complex of biologically active substances isolated from deer musk]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(4):18–37. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-17-4-18-37.
5. ТУ 01.49.24-001-58709973-2017. Биологически активная добавка к пище «Концентрат мускуса кабарги». [ТУ 01.49.24-001-58709973-2017. Biologicheskii aktivnaya dobavka k pishche «Kontsentrat muskusa kabargi» [Biologically active food supplement “Musk deer concentrate”]. (In Russian)].
6. ТУ 10.89.19-001-43217402-2020. Фосфатидилхолин эссенциальный. [ТУ 10.89.19-001-43217402-2020. Fosfatidilkholin essentsial'nyy [Phosphatidylcholine essential]. (In Russian)].
7. Швец В.И., Краснопольский Ю.М., Сорокумова Г.М. Липосомальные формы лекарственных препаратов: технологические особенности получения и применение в клинике. М.: Ремедиум; 2016:197. [Shvets V.I., Krasnopol'skiy Yu.M. Soroko-umova G.M. Liposomal'nyye formy lekarstvennykh preparatov: tekhnologicheskiye osobennosti polucheniya i primeneniye v klinike [Liposomal forms of medicinal preparations: technological features of production and clinical application]. Moscow: Remedium Publ.; 2016:197. (In Russian)].
8. Шестаков Н.В., Лосенкова С.О., Закалюкина Е.В., Степанова Э.Ф. Ассортимент и характеристики трансмукозальных лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):96–101. [Shestakov N.V., Losenkova S.O., Zakalyukina E.V., Stepanova E.F. Assortiment i kharakteristiki transmukozal'nykh lekarstvennykh form [Range and characteristics of transmucosal dosage forms]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv [Drug development & registration]*. 2017;(2):96–101. (In Russian)].
9. Kaptsov V.V. Production PPC Bbmicron emulsions and liposomes with high pressure homogenizer «Donor-1». *Art. Cells Blood Subs. Immob. Biotech*. 1994;22(5):A110.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

**e-mail: [mobitek-m@mail.ru](mailto:mobitek-m@mail.ru)**

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

**e-mail: [mobitek-m@mail.ru](mailto:mobitek-m@mail.ru)**

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

**e-mail: [mobitek-m@mail.ru](mailto:mobitek-m@mail.ru)**

**Irina N. Lyublinskaya\***, Scientific-Production Firm “MOBITEK-M”;

**e-mail: [mobitek-m@mail.ru](mailto:mobitek-m@mail.ru)**

**Колоскова Елена Михайловна**, к.б.н.,  
ООО «Научно-производственная фирма  
“МОБИТЕК-М”»;  
[e-mail: heleko3@yandex.ru](mailto:heleko3@yandex.ru)

**Керемецкая Лариса Фёдоровна**, ООО «Научно-  
производственная фирма “МОБИТЕК-М”»;  
[e-mail: mobitek-m@mail.ru](mailto:mobitek-m@mail.ru)

**Азизов Ариф Мурсалн Оглы**, ООО «Научно-  
производственная фирма “МОБИТЕК-М”»;  
[e-mail: ximreaktiv@gmail.com](mailto:ximreaktiv@gmail.com)

**Каркищенко Владислав Николаевич**, д.м.н.,  
проф., ФГБУН «Научный центр биомедицин-  
ских технологий ФМБА России»;  
[e-mail: scbmt@yandex.ru](mailto:scbmt@yandex.ru)

**Нестеров Максим Сергеевич**, ФГБУН «Науч-  
ный центр биомедицинских технологий ФМБА  
России»;  
[e-mail: mdulya@gmail.com](mailto:mdulya@gmail.com)

**Капцов Александр Владимирович**, ФГБУН  
«Научный центр биомедицинских технологий  
ФМБА России»;  
[e-mail: a\\_v\\_kaptsov@mail.ru](mailto:a_v_kaptsov@mail.ru)

**Шарабанов Андрей Вячеславович**, ФГБУН  
«Научный центр биомедицинских технологий  
ФМБА России»;  
[e-mail: shav@scbmt.ru](mailto:shav@scbmt.ru)

**Агельдинов Руслан Андреевич**, ФГБУН  
«На-учный центр биомедицинских техноло-  
гий ФМБА России»; ФГБОУ ВО «Российский  
химико-технологический университет имени  
Д.И. Менделеева»;  
[e-mail: ageldinov@gmail.com](mailto:ageldinov@gmail.com)

**Герасимов Владимир Николаевич**, д.б.н.,  
ФБун «Государственный научный центр при-  
кладной микробиологии и биотехнологии»;  
[e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org](mailto:ilcvngerasimov@obolensk.org)

**Elena M. Koloskova**, Cand. Sci. (Biol.), Scientific-  
Production Firm “MOBITEK-M”;  
[e-mail: heleko3@yandex.ru](mailto:heleko3@yandex.ru)

**Larisa F. Keremetskaya**, Scientific-Production  
Firm “MOBITEK-M”;  
[e-mail: mobitek-m@mail.ru](mailto:mobitek-m@mail.ru)

**Arif M. Azizov**, Scientific-Production Firm  
“MOBITEK-M”;  
[e-mail: ximreaktiv@gmail.com](mailto:ximreaktiv@gmail.com)

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

**Maksim S. Nesterov**, Scientific Center of Bio-  
medical Technologies of the Federal Medical  
and Biological Agency of Russia;  
[e-mail: mdulya@gmail.com](mailto:mdulya@gmail.com)

**Alexander V. Kaptsov**, Scientific Center of Bio-  
medical Technologies of the Federal Medical  
and Biological Agency of Russia;  
[e-mail: a\\_v\\_kaptsov@mail.ru](mailto:a_v_kaptsov@mail.ru)

**Andrey V. Sharabanov**, Scientific Center of Bio-  
medical Technologies of the Federal Medical  
and Biological Agency of Russia;  
[e-mail: shav@scbmt.ru](mailto:shav@scbmt.ru)

**Ruslan A. Ageldinov**, Scientific Center of Bio-  
medical Technologies of the Federal Medical  
and Biological Agency of Russia; D.I. Mendeleev  
Russian Chemical Technology University;  
[e-mail: ageldinov@gmail.com](mailto:ageldinov@gmail.com)

**Vladimir N. Gerasimov**, Dr. Sci. (Biol.), State  
Research Center for Applied Microbiology and Bio-  
technology;  
[e-mail: ilcvngerasimov@obolensk.org](mailto:ilcvngerasimov@obolensk.org)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



## ОСОБЕННОСТИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ РИТМА СЕРДЦА САМЦОВ И САМОК КРЫС WISTAR

В.Н. Коробова\*, И.И. Бобынцев, А.О. Ворвуль

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России  
305041, Российская Федерация, Курск, ул. К. Маркса, 3

В работе изучены показатели variability ритма сердца (BPC) бодрствующих крыс Wistar с использованием неинвазивной методики регистрации кардиосигнала. Установлены значимые различия в величине показателей BPC в группах животных, различающихся по спектральным параметрам (общая мощность спектра (TP), высоко- (HF) и низкочастотные (LF) компоненты спектра). Показана высокая информативность следующих показателей BPC: статистических (SDNN — стандартное отклонение полного массива интервалов RR, RMSSD — корень квадратный среднеквадратических отклонений последовательных RR-интервалов, CV — коэффициент вариации) и спектральных (TP, HF, LF, VLF — очень низкочастотный компонент спектра BPC, LF/HF — индекс вагосимпатического взаимодействия, IC — индекс централизации). Полученные данные необходимо учитывать для дальнейшего развития методологии изучения патогенетических механизмов изменения BPC и определения прогностического значения указанных параметров BPC.

**Ключевые слова:** variability сердечного ритма, кардиосигнал, спектральный анализ, крысы Wistar, половые различия

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование работы:** работа выполнена при поддержке ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России (договор № 16 возмездного оказания услуг от 17.03.2022).

**Для цитирования:** Коробова В.Н., Бобынцев И.И., Ворвуль А.О. Особенности variability ритма сердца самцов и самок крыс Wistar. *Биомедицина*. 2023;19(1):22–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-22-33>

Поступила 20.06.2022

Принята после доработки 27.09.2022

Опубликована 10.03.2023

## FEATURES OF HEART RATE VARIABILITY IN MALE AND FEMALE WISTAR RATS

Victoria N. Korobova\*, Igor I. Bobyntsev, Anton O. Vorvul

Kursk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia  
305041, Russian Federation, Kursk, Karla Marksa Str., 3

In this study, we investigated the heart rate variability (HRV) of awake male and female Wistar rats using a non-invasive technique of electrocardiosignal recording. We established significant differences in the value of HRV indicators in groups of animals differing in spectral parameters (total power of the spectrum (TP), high-(HF) and low-frequency (LF) components of the spectrum). The following HRV indicators were shown to be highly informative: statistical (SDNN — the standard deviation of the complete array of RR intervals, RMSSD — the square root of the standard deviations of successive RR intervals, CV — the coefficient of variation) and spectral (TP, HF, LF, VLF is a very low-frequency component of the HRV spectrum, LF/HF is the vagosympathetic interaction index, IC — centralization index). The data obtained should be taken into account when advancing the existing methodology for studying the pathogenetic mechanisms of HRV changes and determining the prognostic value of these HRV parameters.

**Keywords:** heart rate variability, electrocardiosignal, Wistar rats, spectrum analysis, male rats, female rats, sex differences

**Conflict of interest:** the authors declare no conflicts of interest.

**Funding:** the study was supported by Kursk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia (contract for the provision of paid services No. 16 of 17.03.2022).

**For citation:** Korobova V.N., Bobyntsev I.I., Vorvul A.O. Features of Heart Rate Variability in Male and Female Wistar Rats. *Journal Biomed.* 2023;19(1):22–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-22-33>

Submitted 20.06.2022

Revised 27.09.2022

Published 10.03.2023

## Введение

Вариабельность сердечного ритма является важным показателем в медико-биологических и клинических исследованиях для оценки вегетативного статуса, адаптационных возможностей организма при действии различных факторов внешней среды, а также в преморбидной диагностике ряда заболеваний и прогнозировании течения заболевания и его исхода [14]. Однако интерпретация этих результатов и формулирование обоснованных выводов по ним является достаточно сложным и дискуссионным вопросом. Данное обстоятельство обусловлено сочетанным влиянием на вариабельность сердечного ритма многочисленных факторов внешних (температура, уровень шума и света, длительность и условия записи ЭКГ) и внутренних факторов (индивидуальные психофизиологические особенности испытуемых, пол, возраст, перенесённые и существующие заболевания), что существенно затрудняет выявление причинно-следственных связей при различных состояниях организма [21]. При этом условия эксперимента позволяют моделировать сходные с человеком патологические процессы и изучать их в стандартных условиях на однородных группах подопытных животных [11, 13].

Изначально исследования по оценке показателей вариабельности сердечного ритма и вегетативного статуса у крыс проводились на наркотизированных животных, и было установлено резкое снижение всех волн спектра при доминировании высоко-

частотного компонента, что объяснялось угнетением центральных нервных влияний и активностью надсегментарных нервных структур [3]. Однако известно, что наркоз повышает риск ошибочных выводов, т. к. мощность спектра сердечного ритма одинаково снижается как в условиях стресса, так и наркоза [7]. Поэтому необходимо проведение исследований вариабельности ритма сердца на бодрствующих животных, и существующие программно-аппаратные комплексы позволяют проводить такую оценку параметров вариабельности сердечного ритма с помощью неинвазивных электродов.

Анализ результатов исследований вариабельности ритма сердца, их прогностической роли, особенностей изменения отдельных параметров при действии факторов внешней среды, а также при наличии различных патологических процессов, обусловил необходимость стандартизации данной методики у крыс Wistar. Данные животные широко используются в биомедицинских экспериментах, в т. ч. при изучении механизмов стресса и его коррекции вследствие их низкой стрессоустойчивости [10]. При этом известно, что одно и то же стрессорное воздействие по-разному влияет на поведение, эмоциональную реакцию и стрессоустойчивость крыс разных пород и линий [2].

**Целью** данной работы являлось изучение показателей вариабельности ритма сердца бодрствующих крыс Wistar с ис-

пользованием неинвазивной методики регистрации кардиосигнала.

## Материалы и методы

### Животные

Исследование выполнено на крысах Wistar в возрасте 5–6 мес. массой 250–300 г, полученных из SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН (n=73, 44 самца и 29 самок). Животные содержались в пластиковых клетках при температуре воздуха  $22 \pm 2$  °C, световом режиме 12/12 ч, со свободным доступом к гранулированному корму и воде. В каждой клетке было по 4–5 однополых особей. Все эксперименты выполнялись в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и Европейской конвенции Directive 2010/63/EU и были одобрены Региональным этическим комитетом при Курском государственном медицинском университете Минздрава России.

### Исследование variability сердечного ритма

Оценку variability ритма сердца проводили при помощи беспроводной системы регистрации и анализа электрокардиосигнала животных «Физиобелт 2.5.1» (ООО «Нейроботикс», Россия), которая представляет собой компактное устройство (60×36×15 мм, масса 35 г) с двумя контактными электродами, которые фиксируются на животном посредством жилета и позволяют сохранять возможность свободного перемещения крысы. Для адаптации животного к данной методике регистрации ЭКГ за неделю до начала эксперимента красам проводили пробные записи длительностью 5–7 мин 3–4 раза в неделю. Эксперименты выполняли в течение двух недель с 1000 до 1400, запись ЭКГ начи-

налась после 10–20 мин адаптации крысы к устройству. Анализ variability ритма сердца проводили по статистическим, геометрическим и спектральным (частотным) показателям [1, 12].

Статистические показатели variability сердечного ритма: ЧСС — частота сердечных сокращений, RRNN — средняя длительность интервалов RR, SDNN — стандартное отклонение полного массива интервалов RR, RMSSD — корень квадратный среднеквадратических отклонений последовательных RR-интервалов, pNN3 (pNN5, pNN10) — отношение числа последовательных пар RR-интервалов, отличающихся более чем на 3 мс (5 мс, 10 мс), к общему числу RR-интервалов, CV — коэффициент вариации.

*Геометрические показатели variability сердечного ритма:* Mo — диапазон значений наиболее часто встречающихся значений RR, AMo — число кардиосигналов, соответствующих значению моды, BP — вариационный размах, IBP — индекс вегетативного равновесия, ПАПР — показатель адекватности процессов регуляции.

*Спектральные (частотные) показатели variability сердечного ритма:* TP — суммарная мощность спектра BPC, HF (мс<sup>2</sup>) — суммарная мощность высокочастотного компонента BPC, LF (мс<sup>2</sup>) — суммарная мощность низкочастотного компонента BPC, VLF (мс<sup>2</sup>) — суммарная мощность очень низкочастотного компонента BPC, HF (%) — мощность спектра высокочастотного компонента variability в % от суммарной мощности колебаний, LF (%) — мощность спектра низкочастотного компонента variability в % от суммарной мощности колебаний, VLF (%) — мощность спектра очень низкочастотного компонента variability в % от суммарной мощности колебаний, LF/HF — индекс вагосимпатического взаимодействия, IC — индекс централизации.

### Статистическая обработка

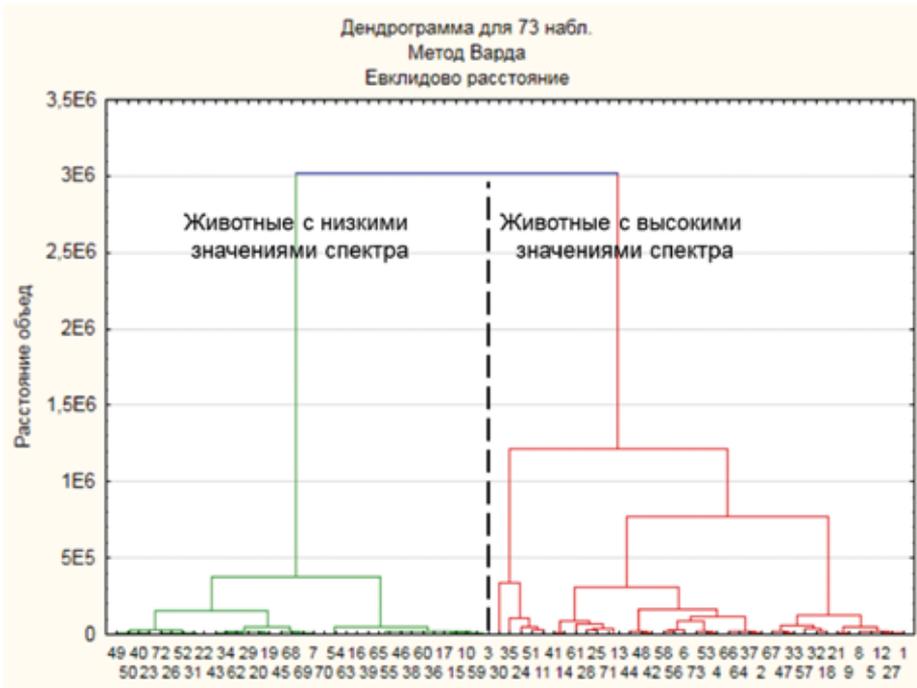
Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 13 («StatSoft Inc.», США). Для проверки гипотезы о нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка, равенства дисперсий — критерий Левене. Полученные данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). Достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента с поправкой Уэлча. Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследований

Как видно из табл. 1, при сравнительной оценке значений всех показателей ВСР у самок и самцов крыс Wistar достоверных различий установлено не было. При этом обращает внимание отсутствие значимых различий между группами в относительном соотношении спектральных показателей высоко-, низко- и очень низкочастотных компонентов вариабельности сердечного ритма. В группах установлена следующая градация спектральных компонентов:  $VLF > LF > HF$ , что свидетельствует о равнозначности влияний различных механизмов управления на функциональное

**Таблица 1.** Показатели вариабельности сердечного ритма самок и самцов крыс Wistar  
**Table 1.** Heart rate variability indicators in male and female Wistar rats

Показатели	Группы ( $M \pm SD$ )		p
	самки (n=29)	самцы (n=44)	
ЧСС, уд./мин	467,0±39,2	455,8±36,0	0,21487
RRNN, мс	129,5±13,0	132,5±11,3	0,30220
SDNN, мс	113,5±46,5	113,1±67,9	0,98112
RMSSD, мс	10,3±2,6	10,1±3,3	0,77007
pNN3, %	77,6±14,3	74,1±17,0	0,36393
pNN5, %	63,4±14,4	59,7±17,4	0,34640
pNN10, %	43,1±14,0	39,9±15,3	0,36674
CV, %	87,6±34,7	84,4±49,5	0,76708
Mo, мс	129,6±13,0	132,2±11,0	0,36481
AMo, мс	37,2±10,9	38,6±11,6	0,60560
BP, мс	53,4±13,9	51,6±16,5	0,63189
ИБР, отн. ед.	0,8±0,6	0,9±0,4	0,71160
ПАПР, отн. ед.	0,3±0,1	0,3±0,1	0,77492
TP, мс <sup>2</sup>	96604,2±83447,9	101632,9±106165,6	0,83047
HF, мс <sup>2</sup>	13598,7±7130,4	12549,4±9021,5	0,59993
LF, мс <sup>2</sup>	32392,8±24849,0	31506,5±34464,2	0,90528
VLF, мс <sup>2</sup>	50612,7±67588,1	57577,1±76482,7	0,69161
HF, %	21,3±11,3	23,0±16,6	0,64364
LF, %	37,3±15,2	31,3±15,0	0,10221
VLF, %	41,4±20,1	45,7±23,6	0,41833
LF/HF	2,3±1,5	2,2±1,6	0,62936
IC	6,6±8,3	8,0±12,9	0,60060



**Рис.** Результаты кластерного анализа  
**Fig.** Results of cluster analysis.

состояние подопытных животных в указанных группах.

Таким образом, отсутствие достоверных различий в отношении всех исследуемых показателей ВРС между группами животных, разделённых по полу, позволяет объединить их для дальнейшего исследования в общую группу.

Для спектральных показателей ВРС характерна достаточно высокая информативность при оценке значимости отдельных компонентов вегетативной регуляции на функциональное состояние организма [5]. В этой связи с использованием спектральных показателей (TP, мс<sup>2</sup>; HF, мс<sup>2</sup>; LF, мс<sup>2</sup>), отражающих состояние вегетативной регуляции, был выполнен кластерный анализ с построением иерархических деревьев (древовидных диаграмм, пример представлен на рис.). Кластеризация проводилась по методу Варда [18], в качестве меры

близости было использовано Евклидово расстояние (геометрическое расстояние в многомерном пространстве). По его результатам выделяли две группы — с низкими и высокими значениями спектра.

В табл. 2 представлены результаты кластерного анализа с выделением животных с высокими (ВЗС, n=38) и с низкими значениями спектра (НЗС, n=35).

Распределение животных по величине основных спектральных характеристик позволило установить достоверные различия по всем исследуемым статистическим, геометрическим и частотным показателям ВРС, наиболее выраженные для SDNN, RMSSD, CV, TP, HF, LF, VLF, LF/HF и IC. Так, величина показателей в первой группе животных с высокими значениями спектра выше, чем во второй группе по значению параметра SDNN — в 2 раза, RMSSD — в 1,5 раза, CV — в 1,9 раза, TP — в 5,7 раза,

**Таблица 2.** Показатели вариабельности сердечного ритма крыс Wistar с высокими и низкими значениями спектра  
**Table 2.** Heart rate variability indicators in Wistar rats with high and low spectrum values

Показатели	Группы (M±SD)		P
	ВЗС (n=38)	НЗС (n=35)	
ЧСС, уд./мин	451,7±40,0	469,7±32,5	0,03928
RRNN, мс	134,0±13,7	128,4±9,1	0,04277
SDNN, мс	148,4±52,3	75,1±41,8	<0,00001
RMSSD, мс	12,0±2,1	8,3±2,6	<0,00001
pNN3, %	80,6±11,4	69,9±18,4	0,00359
pNN5, %	66,9±11,4	55,0±18,5	0,00135
pNN10, %	46,7±10,1	35,1±16,7	0,00054
CV, %	111,0±38,0	58,2±32,1	<0,00001
Mo, мс	134,1±13,6	128,1±8,7	0,02951
AMo, мс	34,7±10,1	41,7±11,5	0,00693
BP, мс	61,3±12,7	42,5±11,9	<0,00001
ИБР, отн. ед.	0,6±0,2	1,1±0,6	<0,00001
ПАПР, отн. ед.	0,3±0,1	0,3±0,1	0,00048
TP, мс <sup>2</sup>	164827,6±94334,8	28855,0±20269,5	<0,00001
HF, мс <sup>2</sup>	17552,2±7952,6	7987,2±5245,8	<0,00001
LF, мс <sup>2</sup>	53777,8±28143,3	8060,6±5403,5	<0,00001
VLF, мс <sup>2</sup>	93497,6±83193,1	12807,1±12816,4	<0,00001
HF, %	13,0±7,4	32,5±13,8	<0,00001
LF, %	37,3±17,8	29,8±10,8	0,03291
VLF, %	49,7±23,2	37,8±19,5	0,02067
LF/HF	3,3±1,3	1,1±0,6	<0,00001
IC	11,5±14,2	3,1±3,2	0,00104

HF (мс<sup>2</sup>) — в 2,2 раза, LF (мс<sup>2</sup>) — в 6,7 раза, VLF (мс<sup>2</sup>) — в 7,3 раза, LF/HF — в 3 раза и IC — в 3,7 раза (p<0,00001).

В выделенных группах также установлена различная градация спектральных компонентов ВРС: у животных с ВЗС преобладали VLF-волны — 49,7% и LF-волны — 37,3%, в то время как HF-волны составили всего 13%. Спектр у крыс с НЗС был относительно уравновешен по соотношению волновых компонентов: VLF-волны — 37,8%, HF-волны — 32,5%, LF-волны — 29,8%.

В связи с установленной нами зависимостью механизмов регуляции функционального состояния крыс от величины спектральных показателей ВРС дальнейшим этапом нашей работы являлось выявление

различий данных параметров ВРС внутри групп самцов и группы самок (табл. 3 и 4).

В группе самцов не установлено существенных различий по величине ЧСС и, соответственно, по значениям RRNN и Mo, а также по LF (%) и VLF (%). В то время как в анализируемых выше разнополюх группах крыс (табл. 2) указанные показатели имели достоверные различия. При этом у самцов с ВЗС значения ряда показателей были значительно выше, чем у животных с НЗС: SDNN — в 2,2 раза, RMSSD — в 1,5 раза, CV — в 2,1 раза, TP — в 4,6 раза, HF (мс<sup>2</sup>) — в 2,3 раза, LF (мс<sup>2</sup>) — в 5,4 раза, VLF (мс<sup>2</sup>) — в 5 раз, LF/HF — в 2,6 раза и IC — в 3 раза (p<0,0001). Процентное соотношение частот в спектре в группе с ВЗС имело следующую градацию: VLF-

**Таблица 3.** Показатели вариабельности сердечного ритма самцов крыс Wistar с высокими и низкими значениями спектра

**Table 3.** Heart rate variability indicators in male Wistar rats with high and low spectrum values

Показатели	Группы (M±SD)		p
	ВЗС (n=20)	НЗС (n=24)	
ЧСС, уд./мин	444,5±36,9	465,3±33,1	0,05438
RRNN, мс	136,0±12,7	129,6±9,2	0,05804
SDNN, мс	160,9±62,6	73,3±41,6	<0,00001
RMSSD, мс	12,5±2,4	8,2±2,6	<0,00001
pNN3, %	81,3±13,9	68,1±17,4	0,00921
pNN5, %	67,8±13,8	53,0±17,5	0,00389
pNN10, %	47,8±11,3	33,3±15,2	0,00103
CV, %	118,8±45,9	55,8±31,0	<0,00001
Mo, мс	135,2±13,0	129,7±8,6	0,10053
AMo, мс	34,2±10,0	42,3±11,7	0,01925
BP, мс	62,0±15,4	43,0±11,9	0,00004
ИБР, отн. ед.	0,6±0,2	1,1±0,5	0,00011
ПАПР, отн. ед.	0,3±0,1	0,3±0,1	0,00475
TP, мс <sup>2</sup>	177216,9±109901,3	38646,3±44573,8	<0,00001
HF, мс <sup>2</sup>	18243,4±9182,8	7804,4±5551,0	0,00003
LF, мс <sup>2</sup>	56754,2±34512,5	10466,8±14847,9	<0,00001
VLF, мс <sup>2</sup>	102219,3±91566,6	20375,2±28858,6	0,00016
HF, %	12,9±9,2	31,3±16,9	0,00008
LF, %	35,2±18,3	28,1±10,9	0,12380
VLF, %	51,9±23,6	40,5±22,7	0,11080
LF/HF	3,2±1,4	1,3±1,1	0,00001
IC	12,6±17,5	4,2±4,8	0,02908

волны — 51,9%, LF-волны — 35,2%, HF-волны — 12,9%. В группе самцов с НЗС градация показателей имела другое распределение: VLF-волны — 40,5%, HF-волны — 31,3%, LF-волны — 28,2%

У самок крыс установлено, что величина ряда показателей в группе с ВЗС значительно выше: SDNN — в 1,6 раза, RMSSD — в 1,3 раза, CV — в 1,5 раза, TP — в 4,2 раза, HF (мс<sup>2</sup>) — в 1,5 раза, LF (мс<sup>2</sup>) — в 2,9 раза, VLF (мс<sup>2</sup>) — в 7,9 раза, LF/HF — в 2,1 раза и IC — в 4,4 раза (p<0,0001). Процентное соотношение частот в спектре в группе с ВЗС располагалось следующим образом: VLF-волны — 57,7%, LF-волны — 32,5%, HF-волны — 9,8%, что соответствует данным неразделённой по полу группы и группы самцов с ВЗС. При этом спектр в самок

с НЗС был следующим: LF-волны — 39,5%, VLF-волны — 34%, HF-волны — 26,5%.

### Обсуждение результатов

Анализ литературы свидетельствует о необходимости стандартизации подхода в оценке ВРС у крыс вследствие достаточно широкого разнообразия методологических подходов и программно-аппаратного оснащения, а также видов используемых лабораторных животных, что существенно затрудняет сравнение и интерпретацию результатов, полученных различными авторами [5, 13, 16]. В результате проведённого нами исследования показателей ВРС было установлено отсутствие достоверной разницы у самцов и самок крыс Wistar по всем 22-м параметрам. Также было показано от-

**Таблица 4.** Показатели вариабельности сердечного ритма самок крыс Wistar с высокими и низкими значениями спектра

**Table 4.** Heart rate variability indicators in female Wistar rats with high and low spectrum values

Показатели	Группы (M±SD)		p
	ВЗС (n=9)	НЗС (n=20)	
ЧСС, уд./мин	447,1±51,8	476,0±29,3	0,06581
RRNN, мс	136,1±18,8	126,5±8,3	0,06466
SDNN, мс	153,3±31,2	95,5±41,1	0,00087
RMSSD, мс	12,3±1,3	9,5±2,6	0,00374
pNN3, %	84,2±3,9	74,6±16,2	0,09299
pNN5, %	69,6±4,7	60,7±16,4	0,12503
pNN10, %	49,2±7,5	40,4±15,5	0,11698
CV, %	113,7±25,3	75,8±32,3	0,00436
Mo, мс	137,9±18,2	125,9±7,9	0,01858
AMo, мс	38,0±10,1	36,9±11,5	0,79880
BP, мс	62,8±9,0	49,2±13,8	0,01195
ИБР, отн. ед.	0,6±0,2	0,9±0,8	0,28639
ПАПР, отн. ед.	0,3±0,1	0,3±0,1	0,61170
TP, мс <sup>2</sup>	204181,2±61125,7	48194,6±27206,5	<0,00001
HF, мс <sup>2</sup>	17841,5±7557,6	11689,5±6205,9	0,028772
LF, мс <sup>2</sup>	59049,1±20246,6	20397,5±15789,8	<0,00001
VLF, мс <sup>2</sup>	127290,6±78174,8	16107,6±10979,0	<0,00001
HF, %	9,8±5,5	26,5±9,2	0,00003
LF, %	32,5±16,4	39,5±14,5	0,26372
VLF, %	57,7±20,1	34,0±15,5	0,00176
LF/HF	3,7±1,4	1,7±1,0	0,00015
IC	14,1±12,1	3,2±1,5	0,00041

сутствие значимых различий между группами самцов и самок крыс Wistar в относительном соотношении спектральных показателей высоко-, низко- и очень низкочастотных компонентов вариабельности сердечного ритма. При этом градация спектральных компонентов была следующей: VLF > LF > HF, что свидетельствует о равнозначности вклада различных механизмов управления в функциональное состояние подопытных животных [8].

В работе Е.В. Курьяновой с соавт. при анализе ЧСС, Mo, ИИ, HF (%), LF (%) и VLF (%) было указано, что регуляция кардиоритма самок нелинейных крыс осуществляется при более высоких, чем у самцов, адренергических влияниях через гуморальный и нервный каналы регуляции [20]. В связи

с высокой долей в спектре ВРС самок волн VLF наряду с волнами HF-диапазона волновая структура сердечного ритма представляется более сложной, чем у самцов [6, 15]. Однако изучение особенностей адрено- и холинореактивности особей разного пола до сих пор остаётся актуальной задачей, поскольку не получено однозначных результатов, подтверждающих закономерные изменения симпатoadреналовой активности в зависимости от пола. Различия в механизмах регуляции сердечного ритма в зависимости от исходного состояния вегетативного баланса показаны и в смешанных по полу группах, отличающихся по абсолютной мощности HF-волн [9, 17].

Распределение самцов и самок крыс Wistar на две группы в зависимости от вели-

чины спектральных показателей (TP,  $\text{mc}^2$ ; HF,  $\text{mc}^2$ ; LF,  $\text{mc}^2$ ) с использованием кластерного анализа позволило установить достоверные различия по всем исследуемым параметрам. Необходимость исследования ВРС крыс путём анализа не только спектральных показателей, но и геометрических, и статистических параметров была отмечена в более ранних исследованиях [13]. В нашем исследовании наиболее значимые различия отмечались по показателям SDNN, RMSSD, CV, TP, HF, LF, VLF, LF/HF и IC. При этом процентное соотношение частот в спектре в выделенных группах было различно. У крыс с ВЗС отмечена градация VLF > LF > HF, что позволяет предполагать у данных животных стабильное функционирование системы регуляции с участием гипоталамо-гипофизарных и периферических катехоламинергических механизмов [6]. Спектр крыс с НЗС в виде VLF > HF > LF свидетельствует об усилении активности гипоталамических нейронов и превалирующем влиянии парасимпатической нервной системы [5].

Группы самцов с ВЗС и НЗС имели достоверные различия по большинству исследуемых параметров с наибольшей выраженностью по показателям SDNN, RMSSD, CV, TP, HF, LF, VLF, LF/HF и IC. Установленные особенности в процентном соотношении частот спектра полностью соответствовали таковым в смешанных по полу группах. Отсутствие достоверных различий в показателях ЧСС, RRNN и Mo между выделенными группами может свидетельствовать о стабилизации интегральных вегетативных и центральных механизмов регуляции на одинаковом уровне [12].

Обращает внимание, что при кластерном анализе у самок преобладали особи с НЗС (69%), и достоверные различия установлены по большинству исследуемых параметров. Процентное соотношение частот в спектре самок с ВЗС в виде VLF > LF-волны > HF, что соответствует данным смешанной группы и самцов с ВЗС. Спектр группы самок с НЗС LF > VLF > HF может быть следствием преобладания симпатических влияний на регуляторные механизмы и действием эстрогенов, роль которых у особей с низким спектром выше, чем у особей с высоким спектром [6, 15].

Полученные данные также подтверждают заключения ряда авторов о важном значении исходного уровня вегетативной регуляции при изучении особенностей величины показателей ВРС.

### **Заключение**

Изучение показателей вариабельности ритма сердца бодрствующих крыс Wistar с использованием неинвазивной методики регистрации кардиосигнала позволило установить достоверные различия при выделении групп животных в зависимости от спектральных параметров (общая мощность спектра, высоко- и низкочастотные компоненты спектра). Показана высокая информативность показателей SDNN, RMSSD, CV, TP, HF ( $\text{mc}^2$ ), LF ( $\text{mc}^2$ ), VLF ( $\text{mc}^2$ ), LF/HF и IC. Полученные данные имеют значение для методологии изучения патогенетических механизмов изменения вариабельности сердечного ритма и определения прогностического значения указанных параметров.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В., Гаврилушкин А.П., Довгалецкий П.Я., Кукушкин Ю.А., Миронова Т.Ф., Прилуцкий Д.А., Семенов А.В., Федоров В.Ф., Флейшман А.Н., Медведев М.М. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем (методические рекомендации). *Вестник аритмологии*. 2002;24(6):65–87. [Baevskiy R.M., Ivanov G.G., Chireykin L.V., Gavrilushkin A.P., Dovgalevskiy P.Ya., Kukushkin Yu.A., Mironova T.F., Prilutskiy D.A., Semenov A.V., Fedorov V.F., Fleyshman A.N., Medvedev M.M. Analiz variabel'nosti serdechnogo ritma pri ispol'zovanii razlichnykh elektrokardiograficheskikh sistem (metodicheskie rekomendatsii) [Analysis of heart rate variability using different electrocardiographic systems (guidelines)]. *Vestnik aritmologii* [Journal of Arrhythmology]. 2002;24(6):65–87. (In Russian)].
2. Геворкян В.С. Исследование воздействия одних и тех же стресс-факторов на поведение крыс разных видов и линий. *Электронное научное издание Альманах Пространство и Время*. 2017;15(1):10. [Gevorkyan V.S. Issledovanie vozdeystviya odnix i tekhn zhe stress-faktorov na povedenie krysov raznykh vidov i liniy [Study of impact of same stress factors on behavior of rats of different species and lines]. *Elektronnoe nauchnoe izdanie Almanah Prostranstvo i Vremya* [Electronic Scientific Edition Almanac Space and Time]. 2017;15(1):10. (In Russian)].
3. Курьянова Е.В. Влияние наркоза и рефлекторной стимуляции симпатoadренальной и парасимпатической систем на вариабельность сердечного ритма крыс. *Естественные науки*. 2011;2(35):141–148. [Kuryanova E.V. Vliyaniye narkoza i reflektornoy stimulyatsii simpatoadrenalovoy i parasimpaticheskoy sistem na variabel'nost' serdechnogo ritma krysov [Influence of anesthesia and reflex stimulation of the sympathoadrenal and parasympathetic systems on heart rate variability in rats] *Estestvennye nauki* [Natural sciences]. 2011;2(35):141–148. (In Russian)].
4. Курьянова Е.В., Жукова Ю.Д., Трясучев А.В., Горст Н.А. Влияние скополамина, галантамина и их сочетаний с гексаметонием и атропином на спектральные характеристики сердечного ритма нелинейных крыс. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2016;36(3):5–12. [Kuryanova E.V., Zhukova Yu.D., Tryasuchev A.V., Gorst N.A. Vliyaniye skopolamina, galantamina i ih sochetaniy s geksametoniem i atropinom na spektralnye harakteristiki serdechnogo ritma nelineynykh krysov [Effect of scopolamine, galantamine, and their combinations with hexametonium and atropine on the spectral characteristics of the heart rhythm of nonlinear rats]. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal* [Siberian Scientific Medical Journal]. 2016;36(3):5–12. (In Russian)].
5. Курьянова Е.В., Ситимов А.М., Горст Н.А., Теплый Д.Л. Типологические особенности изменений вариабельности сердечного ритма нелинейных крыс при стимуляции периферических  $\alpha$  1-адренорецепторов. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2013;33(4):12–18. [Kuryanova E.V., Sitimov A.M., Gorst N.A., Teply D.L. Tipologicheskie osobennosti izmeneniy variabel'nosti serdechnogo ritma nelineynykh krysov pri stimulyatsii perifericheskikh  $\alpha$  1-adrenoretseptorov [Typological features of changes in heart rate variability in nonlinear rats upon stimulation of peripheral  $\alpha$  1-adrenergic receptors]. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk* [The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences]. 2013;33(4):12–18. (In Russian)].
6. Курьянова Е.В., Теплый Д.Л. Вариабельность сердечного ритма самцов и самок нелинейных крыс и её изменения при блокаде синтеза катехоламинов. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2009;29(6):38–42. [Kuryanova E.V., Teply D.L. Variabel'nost' serdechnogo ritma samtsov i samok nelineynykh krysov i ee izmeneniya pri blokade sinteza katekolaminov [Heart rate variability in male and female non-linear rats and its changes during blockade of catecholamine synthesis]. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk* [The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences]. 2009;29(6):38–42. (In Russian)].
7. Курьянова Е.В., Трясучев А.В., Ступин В.О., Жукова Ю.Д. Особенности изменений вариабельности сердечного ритма у самцов нелинейных крыс при переходе в наркотический сон на фоне стимуляции центральных нейромедиаторных систем. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020;170(11):536–542. [Kuryanova E.V., Tryasuchev A.V., Stupin V.O., Zhukova Yu.D. Osobennosti izmeneniy variabel'nosti serdechnogo ritma u samtsov nelineynykh krysov pri perekhode v narkoticheskiy son na fone stimulyatsii tsentral'nykh neyromediatornykh sistem [Features of changes in heart rate variability in male nonlinear rats during the transition to anesthesia sleep against the background of stimulation of the central neurotransmitter systems]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2020;170(11):536–542. DOI: 10.47056/0365-9615-2020-170-11-536-542.
8. Курьянова Е.В., Трясучев А.В., Ступин В.О., Жукова Ю.Д., Горст Н.А. Влияние блокады вегетативных ганглиев, М-холино- и  $\beta$ -адренорецепторов миокарда на вариабельность сердечного ритма крыс. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2020;106(1):17–30. [Kuryanova E.V., Tryasuchev A.V., Stupin V.O., Zhukova Yu.D., Gorst N.A. Vliyaniye blokady vegetativnykh gangliyev, M-kholino- i  $\beta$ -adrenoretseptorov miokarda na variabel'nost' serdechnogo ritma krysov. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2020;106(1):17–30. (In Russian)].

- nova E.V., Tryasuchev A.V., Stupin V.O., Jukova Yu.D., Gorst N.A. Vliyaniye blokady vegetativnykh gangliov, M-kholino- i  $\beta$ -adrenoretseptorov miokarda na variabel'nost' serdechnogo ritma kryis [Influence of blockade of the vegetative ganglions, of myocardial m-cholinoreceptors and beta-adrenoreceptors on the heart rate variability in rats]. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova [Russian Journal of Physiology]*. 2020;106(1):17–30. (In Russian)]. DOI: 10.31857/S0869813920010070.
9. Курьянова Е.В., Трясучев А.В., Ступин В.О., Жукова Ю.Д., Горст Н.А. Влияние гексаметония, атропина, анаприлина и их комбинации на вариабельность сердечного ритма нелинейных крыс. *Биомедицина*. 2019;15(3):59–70. [Kuryanova E.V., Tryasuchev A.V., Stupin V.O., Jukova Yu.D., Gorst N.A. Vliyaniye geksametoniya, atropina, anaprilina i ikh kombinatsii na variabel'nost' serdechnogo ritma nelineynykh kryis [Influence of hexametonium, atropine, anapriline and their combination on the heart rate variability in nonlinear rats]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2019;15(3):59–70. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-3-59-70.
10. Курьянова Е.В., Трясучев А.В., Ступин В.О., Теплый Д.Л. Особенности стресс-индуцированных изменений сердечного ритма, адренореактивности эритроцитов и свободнорадикальных процессов в крови на фоне стимуляции центральных нейромедиаторных систем. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2017;37(1):11–20. [Kuryanova E.V., Tryasuchev A.V., Stupin V.O., Teplyi D.L. Osobennosti stress-indutsirovannykh izmeneniy serdechnogo ritma, adrenoreaktivnosti eritrotsitov i svobodnoradikal'nykh protsessov v krvi na fone stimulatsii tsentral'nykh neyromediatornykh sistem [The features of stress-induced changes of the heart rhythm, erythrocytes adrenoreactivity and free radicals processes in blood on the background of stimulation of central neurotransmitter systems]. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal [The Siberian Scientific Medical Journal]*. 2017;37(1):11–20. (In Russian)].
11. Морозова М.П., Гаврилова С.А., Иванов Е.В., Горбачева А.М., Ржавина Е.М., Ердяков А.К., Джемиллова З.Н., Артемова Е.В., Токмакова А.Ю., Кошелев В.Б., Галстян Г.Р. Динамика вариабельности ритма сердца у крыс со стрептозототициновым сахарным диабетом. *Сахарный диабет*. 2019;22(1):44–52. [Morozova M.P., Gavrilova S.A., Ivanov E.V., Gorbacheva A.M., Rjavina E.M., Erdyakov A.K., Dzhemilova Z.N., Artemova E.V., Tokmakova A.Y., Koshelev V.B., Galstyan G.R. Dinamika variabel'nosti ritma serdtsa u kryis so streptozototsinovym sakharnym diabetom [Dynamics of heart rate variability in rats with streptozotocin-induced diabetes]. *Sakharnyy diabet [Diabetes mellitus]*. 2019;22(1):44–52. (In Russian)]. DOI: 10.14341/DM9499.
12. Морозова М.П., Лукошкова Е.В., Гаврилова С.А. Особенности оценки вариабельности ритма сердца у крыс. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2015;101(3):291–307. [Morozova M.P., Lukoshkova E.V., Gavrilova S.A. Osobennosti otsenki variabel'nosti ritma serdtsa u kryis [Some aspects of heart rate variability estimation in rats]. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova [Russian Journal of Physiology]*. 2015;101(3):291–307. (In Russian)].
13. Сальников Е.В., Сидоров А.В., Ноздрачев А.Д., Фатеев М.М. Вариабельность сердечного ритма у крыс, находящихся в различных состояниях. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология*. 2008;(4):137–142. [Salnikov E.V., Sidorov A.V., Nozdrachev A.D., Fateev M.M. Variabel'nost' serdechnogo ritma u kryis, nakhodyashchikhsya v razlichnykh sostoyaniyakh [Heart rate variability in rats under different conditions]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 3. Biologiya [Vestnik of Saint Petersburg University. Biology]*. 2008;(4):137–142. (In Russian)].
14. Шлык Н.И. Нормативы вариационного размаха кардиоинтервалов в покое и ортостазе при разных типах регуляции у лыжников-гонщиков в тренировочном процессе. *Теория и практика физической культуры*. 2021;(12):12–15. [Shlik N.I. Normativy variatsionnogo razmakh kardiointervalov v pokoe i ortostaze pri raznykh tipakh regulyatsii u lyzhnikov-gonshchikov v trenirovochnom protsesse [Standards for variation range of rr-intervals at rest and in orthostasis in training of racing skiers with different types of regulation]. *Teoriya i praktika fizicheskoy kultury [Theory and practice of physical culture]*. 2021;(12):12–15. (In Russian)].
15. Anishchenko T.G., Brill G.E., Romanova T.P., Shorima L.N. Sex-related differences in the degree of lipid peroxidation activation and resistance to cardiovascular damage induced by stress in rats. *Bull. Eksp. Biol. Med.* 1995;119(4):340–343.
16. Fontollet T., Pichot V., Bringard A., Fagoni N., Adami A., Tam E., Furlan R., Barthélémy J.C., Ferretti G. Testing the vagal withdrawal hypothesis during light exercise under autonomic blockade: A heart rate variability study. *J. Appl. Physiol.* (1985). 2018. DOI: 10.1152/jappphysiol.00619.2018.
17. Garabedian C., Champion C., Servan-Schreiber E., Butruille L., Aubry E., Sharma D., Logier R., Deruelle P., Storme L., Houfflin-Debarge V., De Jonckheere J. A new analysis of heart rate variability in the assessment of fetal parasympathetic activity: An experimental study in a fetal sheep model. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180653. DOI: 10.1371/journal.pone.0180653.
18. Joe H., Ward Jr. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. of the American Statistical Association*. 1963;58:236-244. <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>

19. Kastyro I.V., Reshetov I.V., Khamidulin G.V., Shmaevsky P.E., Karpukhina O.V., Inozentsev A.N., Torshin V.I., Ermakova N.V., Popadyuk V.I. The effect of surgical trauma in the nasal cavity on the behavior in the open field and the autonomic nervous system of rats. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020;492(1):121–123. DOI: 10.1134/S1607672920030023.
20. Kur'yanova E.V., Tryasuchev A.V., Stupin V.O., Teplyi D.L. Effect of atropine on adrenergic responsiveness of erythrocyte and heart rhythm variability in outbred rats with stimulation of the central neurotransmitter systems. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018;165(5):597–601. DOI: 10.1007/s10517-018-4221-8.
21. Morozova M.P., Evseev A.M., Banzelyuk E.N., Gavrilova S.A., Prokhorova A.V., Mironova O.G. Autonomic tone is associated with psychological personality profile in girls and boys. *Human Physiology.* 2020;46(5):473–482. DOI: 10.1134/S0362119720050102.

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Коробова Виктория Николаевна\***, к.м.н., ФГБОУ «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России;

**e-mail: [viktoria.korobova@mail.ru](mailto:viktoria.korobova@mail.ru)**

**Бобынцев Игорь Иванович**, д.м.н., проф., ФГБОУ «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России;

**e-mail: [bobig@mail.ru](mailto:bobig@mail.ru)**

**Ворвуль Антон Олегович**, ФГБОУ «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России;

**e-mail: [vorvul1996@mail.ru](mailto:vorvul1996@mail.ru)**

**Victoria N. Korobova\***, Cand. Sci. (Med.), Kursk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;

**e-mail: [viktoria.korobova@mail.ru](mailto:viktoria.korobova@mail.ru)**

**Igor I. Bobyntsev**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Kursk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia,

**e-mail: [bobig@mail.ru](mailto:bobig@mail.ru)**

**Anton O. Vorvul**, Kursk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;

**e-mail: [vorvul1996@mail.ru](mailto:vorvul1996@mail.ru)**

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



## АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ МИРОВЫХ ТРЕНДОВ В ОБЪЕКТИВИЗАЦИИ ПРОТОКОЛОВ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С ПАТОЛОГИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

А.Б. Салмина<sup>1,2</sup>, Я.В. Горина<sup>1,\*</sup>, А.В. Большакова<sup>3</sup>, О.Л. Власова<sup>3</sup>

<sup>1</sup> НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России 660022, Российская Федерация, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

<sup>2</sup> Институт мозга, ФГБНУ «Научный центр неврологии» 105064, Российская Федерация, Москва, ул. Воронцово поле, 14

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» 194021, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 11

Поведенческое фенотипирование грызунов с моделями нейродегенерации привлекает большое внимание учёных в течение последних трёх десятилетий. Тем не менее, по-прежнему существуют определённые сложности в понимании изменчивости поведения, вызванной генетическими, экологическими и биологическими факторами, вмешательством человека и плохо стандартизированными экспериментальными протоколами, что может отрицательно отразиться на интерпретации полученных результатов. В этой статье мы представляем факторы, оказывающие негативное влияние на качество выполнения поведенческого тестирования лабораторных животных, современные подходы по их преодолению, а также новые технологии, такие как визуализация активности нейронов с помощью ионно-зависимых флуоресцентных индикаторов (оптогенетика), которые расширяют границы изучения нейронных сетей, ответственных за поведение, путём оценки функции нейронов как на клеточном, так и на популяционном уровнях, что, в итоге, позволит повысить надёжность полученных результатов и даст возможность по-новому взглянуть на эволюционные парадигмы конкретной трансгенной мышиной модели.

**Ключевые слова:** поведение, нейроповеденческие тесты, факторы, оптогенетика, нейродегенерация

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) (проект № 20-65-46004).

**Для цитирования:** Салмина А.Б., Горина Я.В., Большакова А.В., Власова О.Л. Анализ основных мировых трендов в объективизации протоколов поведенческого тестирования лабораторных животных с патологией головного мозга. *Биомедицина*. 2023;19(1):34–46. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-34-46>

Поступила 27.07.2022

Принята после доработки 12.12.2022

Опубликована 10.03.2023

## ANALYSIS OF MAIN WORLD TRENDS IN OBJECTIVIZATION OF PROTOCOLS FOR BEHAVIORAL TESTING OF LABORATORY ANIMALS WITH BRAIN PATHOLOGY

Alla B. Salmina<sup>1,2</sup>, Yana V. Gorina<sup>1,\*</sup>, Anastasia V. Bolshakova<sup>3</sup>, Olga L. Vlasova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Krasnoyarsk State Medical University  
named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky of the Ministry of Health Care of Russia  
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznaya Str., 1*

<sup>2</sup> *Brain Institute, Research Center of Neurology  
105064, Russian Federation, Moscow, Vorontsovo Pole Str., 14*

<sup>3</sup> *St. Petersburg Polytechnic University of Peter the Great  
19021, Russian Federation, St. Petersburg, Khlopina Str., 11*

Behavioral phenotyping of rodents using neurodegeneration models has received much research attention over the past three decades. However, some difficulties still exist in understanding the variability of behavior caused by genetic, environmental, and biological factors, human intervention and poorly standardized experimental protocols, which can negatively affect the interpretation of the results obtained. In this article, we discuss factors that have a negative impact on the performance of behavioral testing of laboratory animals, modern approaches to overcome them, as well as new technologies, such as visualization of neuronal activity using ion-dependent fluorescent indicators (optogenetics), which expand the boundaries of the study of neuronal networks responsible for behavior by evaluating neuronal function at both the cellular and population levels. Ultimately, this will increase the reliability of the results obtained and provide an opportunity to take a fresh look at the ethological paradigms of a particular transgenic mouse model.

**Keywords:** behavior, neurobehavioral tests, factors, optogenetics, neurodegeneration

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

**Funding:** this work was supported by a grant from the Russian Science Foundation (RSF) (project No. 20-65-46004).

**For citation:** Salmina A.B., Gorina Ya.V., Bolshakova A.V., Vlasova O.L. Analysis of Main World Trends in Objectivization of Protocols for Behavioral Testing of Laboratory Animals with Brain Pathology. *Journal Biomed.* 2023;19(1):34–46. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-34-46>

Submitted 27.07.2022

Revised 12.12.2022

Published 10.03.2023

## Введение

Поведенческое тестирование является неотъемлемым компонентом современных протоколов изучения механизмов развития хронической нейродегенерации с использованием экспериментальных моделей на лабораторных животных. Разработанные к настоящему времени подходы к моделированию хронической нейродегенерации позволяют с той или иной степенью достоверности воспроизвести ключевые патофизиологические процессы, составляющие основу патогенеза этой группы заболеваний: повреждение и гибель клеток нейрональной природы, аккумуляцию aberrantных белков в клетках и межклеточном пространстве, нарушение синаптической пластичности и нейрогенеза, развитие дисметаболических изменений в ткани, нейро-

воспаления и патологической проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Несмотря на существование лимитирующих факторов при использовании тех или иных моделей *in vivo*, в большинстве случаев удаётся зарегистрировать характерные для развития хронической нейродегенерации неврологические дефициты, в частности, когнитивную дисфункцию, нарушение процессов обучения и запоминания, развитие тревожности, изменение социального поведения и интереса к другим объектам, нарушение механизмов принятия решений.

Поведенческое фенотипирование животных с экспериментальной нейродегенерацией, как правило, включает в себя использование «батареи» тестов для оценки когнитивных функций и интереса к новому

(водный лабиринт Морриса, тест Барнеса, Т-образный лабиринт, тест распознавания новых объектов, тест «Открытое поле» и др.), обучения и памяти (тест условно-рефлекторного замирания, тест условно-рефлекторного пассивного избегания, радиальный восьмирукавный лабиринт и др.), эмоционального статуса (форсированное плавание, тест подвешивания за хвост, тест предпочтения сахарозы, тест предпочтения кондиционированного места и др.), социального поведения (трёхкамерный тест, пятипопыточный тест и др.).

В настоящем обзоре мы не ставим перед собой задачу охарактеризовать достоинства и недостатки каждого из перечисленных методических подходов, а фокусируемся на оценке общих для разных протоколов факторов, влияющих на качество выполнения поведенческого тестирования, а также на современных подходах к преодолению этих методологических проблем (автоматизация и цифровизация тестирования) и к идентификации клеток и клеточных ансамблей, ответственных за реализацию тех или иных поведенческих механизмов (оптогенетическая стимуляция) в норме и при нейродегенерации.

### **Объективные и субъективные факторы, определяющие качество выполнения поведенческого**

#### **тестирования лабораторных животных**

При выполнении широкого спектра нейроповеденческих тестов, которые используются для оценки когнитивного статуса, тревожности, сложных форм поведения экспериментальных животных, всё большую значимость приобретает грамотная интерпретация полученных данных. В целом, выполнение любого вида нейроповеденческого тестирования в нейронауках подразумевает наличие некоторых допущений, связанных с интерпретацией поведенческих актов. Это обусловлено несколькими причинами: 1) недостаточная расшифровка данных о механизмах реализации поведен-

ческих реакций у животных разных видов и с разной степенью развития центральной нервной системы; 2) отсутствие некоторых свойственных человеку или высшим приматам сложных форм поведения у экспериментальных животных (грызунов).

В связи с этим при выборе «батареи» поведенческих тестов следует ориентироваться на те из них, которые, с одной стороны, позволяют получить максимально однозначные выводы, с другой стороны, могут быть корректно экстраполированы на аналогичные поведенческие события или когнитивные функции, свойственные человеку или высшим приматам [12, 13, 42, 44].

К числу наиболее значимых условий, которые должны быть соблюдены при проведении поведенческого фенотипирования животных, относятся: 1) соблюдение этических норм и принципа 3R при выборе способов тестирования и подборе экспериментальных животных; 2) обеспечение условий комфортного, контролируемого и легко воспроизводимого микроокружения, минимизирующего влияние «отвлекающих» или «возмущающих» внешних факторов на поведение животных; 3) разработка скрупулёзного и детального дизайна эксперимента, учитывающего влияние различных экспериментальных процедур на результаты поведенческого тестирования; 4) проведение поведенческого тестирования специально обученным и высококвалифицированным персоналом [28, 40].

Handling stress (стресс вследствие взятия животного человеком) относится к числу значимых факторов, искажающих результаты поведенческого тестирования. В частности, недавно было показано, что процедура изъятия животного из клетки и переноса его к лабораторному стенду, используемому для тестирования, влияет на результаты оценки сложных форм поведения: перенос животного в специальном приспособлении (туннель) оказался более благоприятным, по сравнению с переносом путём захвата

за хвост, в частности, по результатам анализа исследовательского интереса [15, 19], причём такие преимущества сохраняются и после дополнительных инвазивных процедур (инъекции, анестезия) [20].

Любой другой вид стрессового фактора значимо меняет поведенческий ответ экспериментальных животных, что очевидно и в классических моделях, например, стресс раннего периода жизни, приводящий к развитию депрессии или повышению риска возникновения нейродегенерации в отдалённые периоды онтогенеза [29, 37], и при анализе поведенческого фенотипа животных, подвергающихся действию стресса социальной изоляции или иммобилизационном стрессе в более позднем периоде развития [27].

Помимо стресса различной природы, следующие факторы определяют ответ животных на действие стимулов, провоцирующих тот или иной вид поведения или способствующих реализации феномена нейропластичности: 1) особенности организации сенсорных систем у грызунов с доминирующим влиянием ольфакторной стимуляции на индукцию механизмов пластичности головного мозга; 2) трудность задачи, поставленной в рамках теста; 3) корректность подбора экспериментальных групп; 4) особенности соотношения индивидуального и социального начала в поведении грызунов; 5) частота повторения тестов и их последовательность; 6) наличие или отсутствие взаимодействий с другими животными в процессе выполнения задания в рамках теста [17].

Кроме того, следует учитывать следующие аспекты реализации когнитивных и поведенческих функций: 1) генетически обусловленная вариабельность; 2) индивидуальный онтогенез; 3) сезон, время суток, состояние здоровья, фазы физиологических циклов у тестируемых животных; 4) состояние рабочей зоны (освещённость, наличие запахов, характер поверхности и т. п.) [13, 36, 43].

Каким образом осуществляется выбор совокупности тестов для оценки нейроповеденческого статуса экспериментальных животных? Для этого следует учитывать следующие позиции: 1) задачи эксперимента по идентификации конкретных поведенческих проявлений тех или иных (пато) физиологических процессов в центральной нервной системе; 2) технические и организационные возможности лаборатории; 3) наличие или отсутствие современных систем регистрации и анализа данных; 4) количество, пол, возраст животных; 5) сложность совокупного дизайна эксперимента; 6) возможность получения результатов с применением минимально допустимого количества животных с минимизированным стрессом при проведении экспериментов.

Вместе с тем, очевидно, что разнообразие имеющихся в распоряжении исследователя тестов сейчас настолько большое, что можно использовать взаимозаменяющие и/или взаимодополняющие протоколы для оценки функциональной активности того или иного региона головного мозга. Например, функция гиппокампа может быть оценена в следующих видах нейроповеденческого тестирования: открытое поле, водный лабиринт Морриса, контекстный тест на условно-рефлекторный страх, Т-образный лабиринт, тестирование принятия решений (память, тревожность, пространственное обучение), а различные виды памяти могут быть проанализированы с использованием следующих протоколов: водный лабиринт Морриса и тест Барнса (пространственная память, некоторые элементы рабочей памяти), тест распознавания нового объекта (ассоциативная память, декларативная память, рабочая память), контекстный тест на условно-рефлекторный страх (ассоциативная память), Y-образный лабиринт (рабочая краткосрочная память) [45].

В целом, интерпретация полученных при проведении поведенческого тестиро-

вания данных представляет собой весьма нетривиальную задачу для исследователя. Следующие аспекты оказывают влияние на результаты анализа: 1) мотивация (мотивировано ли животное к выполнению поставленной в тесте задачи, и насколько наличие такой мотивации соотносится с механизмами развития изучаемой патологии); 2) взаимодействие исследователя и животного (насколько удалось избежать handling stress); 3) трудность задания (насколько задание выполнимо, например, для животных с моторной или когнитивной дисфункцией, нет ли артефактов, возникающих в результате невозможности выполнения в силу иных причин, не учитываемых исследователем); 4) взаимодействие разных протоколов (не может ли результат одного теста влиять на другой, не слишком ли сопряжены по времени разные тесты); 5) уровень общей активности животных (не влияет ли общий уровень активности, например, в результате наличия динамических его изменений в течение суток или в разные

сезоны, на результаты поведенческого тестирования); 6) вариабельность (влияют ли естественные физиологические причины, например, циклические физиологические изменения, на особенности поведения, выявляемые в тестах); 7) дизайн эксперимента (используется ли метод рандомизации, «слепого» анализа при отборе групп и анализе данных); 8) этологическое соответствие (есть ли соответствие между тестируемым — стимулированным — поведением и естественным поведением животных); 9) воспроизводимость результатов (возможно ли получить аналогичные тенденции и закономерности при увеличении выборки животных, а также в других линиях или с использованием животных другого возраста и пола); 10) организация тестирования (могут ли животные тестироваться последовательно или параллельно) [17].

Учёт всех перечисленных аспектов, влияющих на результаты нейроповеденческого тестирования, должен вестись в рамках каждого эксперимента, иначе ин-



Рис. Факторы, влияющие на результаты экспериментальных исследований на животных.  
 Fig. Factors affecting the results of experimental animal studies.

терпретация полученных данных, особенно при сравнении разных групп животных, будет затруднена (рис.).

Повышение качества экспериментов, ориентированных на оценку сложных событий в живых системах (например, анализ межклеточных взаимодействий в системах *in vitro* или анализ поведенческих реакций животных *in vivo*), возможно за счёт автоматизации процессов и использования современных методов регистрации и анализа данных. Для *in vivo* исследований в настоящее время применяют различные способы трекинга животных, автоматизации экспериментальной процедуры, анализа полученных данных, причём применение таких протоколов позволяет решить не только технические, но и этические проблемы [35]. Для *in vitro* исследований используют методы анализа изображений и межклеточных коммуникаций, а также предиктивные модели для оценки эффектов физических, химических и биологических факторов на живые системы [9].

**Современные технологии  
для унификации и повышения  
качества выполнения поведенческих  
тестов в экспериментальной  
нейробиологии**

В поведенческих тестах применение цифровых технологий позволяет достичь автоматизации протокола, что, в свою очередь, актуально для объективизации результатов, минимизации неблагоприятных эффектов взаимодействия «исследователь — животное», оптимизации продолжительности тестирования и снижения трудозатрат на его проведение. Например, автоматические системы могут практически аннулировать эффекты *handling stress* за счёт роботизированных платформ для забора и переноса животных из клеток к лабораторным стендам и обратно, а новые способы меченя животных позволяют проводить тестирование с использованием нескольких животных одновременно, что, например,

важно при оценке социального поведения. Вместе с тем зарегистрированы и определённые ограничения в применении автоматизированных протоколов, например вследствие накопления ошибок, в т. ч. ложноположительных результатов, при многократных повторах поведенческих тестов, что требует применения рациональных методов статистического анализа данных [17].

Примером удачного дополнения стандартных протоколов нейроповеденческого тестирования современными технологическими решениями является разработка беспроводной системы анализа движений головы животного при проведении контекстного теста на условно-рефлекторный страх: зафиксированная на голове животного система позволяет анализировать время замирания, которое характеризует наличие ассоциативной памяти, регистрируемой в этом тесте, что повышает пространственное разрешение в контексте детекции *freezing time* [33]. Не менее интересным является решение, связанное с разработкой усовершенствованной камеры для проведения контекстного теста на условно-рефлекторный страх с прецизионной установкой параметров электрического шока, звука и света, что повышает воспроизводимость результатов тестирования животных [1].

Другим примером использования современных технологических решений при оценке поведения животных является разработка аппаратно-программного комплекса, позволяющего проанализировать социальное поведение путём 3D-видеотрекинга, машинного видения (для идентификации положения тела животного в динамике социального взаимодействия) и машинного обучения для категоризации типа социальных взаимодействий, в т. ч. между животными разных линий [21]. Такая автоматизированная система во многом снижает ресурсозатратность при проведении поведенческих тестов и поэтому может быть использована, например,

при скрининге лекарств-кандидатов, влияющих на сложные формы поведения.

Фактически, такие новые разработки в области цифровизации и автоматизации поведенческого фенотипирования экспериментальных животных относят нас к самым первым работам, посвящённым применению вычислительных методов для анализа поведенческих реакций у лабораторных животных, и эта эволюция соответствует переходу от сугубо описательного характера поведенческих экспериментов к трансляции результатов поведенческого теста в однозначные заключения, базирующиеся на соответствии строго определённым критериям оценки поведенческого акта. В этом контексте особенно актуальным становится сочетание новых подходов к анализу поведенческих реакций с современными технологиями таргетной стимуляции тех или иных клеток головного мозга, что достигается методами оптогенетики, термогенетики, сонногенетики, хемогенетики [2, 10, 14, 22, 31].

При проведении экспериментальных исследований *in vitro* оценка межклеточных взаимодействий, процессов пролиферации, дифференцировки, клеточной миграции и гибели является основным инструментом анализа поведения клеток в культуре, в т. ч. в составе мультиклеточных ансамблей. С этой точки зрения, вычислительные методы и цифровые технологии дают возможность не только корректно оценить множественные события в культуре клеток, но и спрогнозировать поведение клеток при действии иных внешних факторов. Например, это актуально для анализа кинетики клеточных популяций, оптимизации микроокружения для роста и развития клеток, интерпретации результатов клеточной визуализации, оценки результатов применения высокопроизводительных аналитических методов (геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика и др.). В этом контексте особого внимания заслуживают

технологии создания «цифровых двойников» для рационального дизайна экспериментов и моделирования ключевых событий в клеточных культурах, что изначально нашло своё применение в биотехнологии в плане оптимизации состава питательной среды для роста клеток [25]. Другой подход базируется на использовании машинного обучения для оценки проницаемости гематоэнцефалического барьера (*in vitro* модель), что актуально для выбора лекарств-кандидатов, проникающих через барьер в ткань головного мозга для эффективного взаимодействия с молекулами-мишенями [41]. Наиболее часто для решения подобных задач используются такие методы машинного обучения, как Support vector machine (SVM), Random forest (RF), k-nearest neighbors (kNN), Multidimensional Linear Regression (MLR), Linear discriminant analysis (LDA) и Naïve Bayesian classifiers (NBC). В работе [41] был проведён детальный анализ основных технологий машинного обучения, применимых для оценки проницаемости гематоэнцефалического барьера для скрининга лекарств-кандидатов в системах *in vitro*, на основании чего был сделан вывод о предиктивной точности некоторых алгоритмов более 80%.

Интересной сферой приложения для современных цифровых технологий в экспериментальной нейробиологии является разработка микрофизиологических систем с использованием микрофлюидных камер, воспроизводящих условия для функционирования и взаимодействия клеток нейрональной и ненейрональной природы [7, 8, 38, 39]. В частности, при моделировании ткани в формате «орган-на-чипе» существует высокая потребность в онлайн-оценке и интерпретации большого количества данных, характеризующих выживаемость клеток, их функциональную активность, межклеточные взаимодействия, реакцию клеток на изменение состава микроокружения. Технологии машинного обучения, применяемые для этих целей, уже зарекомендо-

вали себя в качестве релевантного подхода к распознаванию общих и частных паттернов поведения клеток, классификации ответов в клеточной популяции, прогнозирования ответа ткани на внешние воздействия. Фактически, речь идёт о создании моделей в формате «орган-на-чипе», сопряжённых с алгоритмами искусственного интеллекта и нейронных сетей, и, вероятно, с *in silico* аналитическими компонентами для воспроизведения максимального соответствия системы *in vitro* реальным условиям функционирования ткани или органа в условиях *in vivo* [30, 46].

В этом контексте актуальны работы, касающиеся анализа популяции индуцированных плюрипотентных клеток (iPSCs), которые используются для тканевой инженерии в нейронауках. В частности, было показано, что алгоритмы машинного обучения хорошо подходят для категоризации клеток-потомков iPSCs, отличающихся по некоторым ключевым признакам и участвующим в процессе эмбриогенеза [16]. Авторы показали, что преимуществом применённой платформы машинного обучения является то, что после настройки и проверки протоколов машинного обучения модули в каждом протоколе могут быть смешаны и сопоставлены для осуществления сравнительного и количественного анализа высокоэффективным способом. Это позволяет получить статистически значимые результаты, например, при идентификации наиболее важных (с регуляторной точки зрения) гуморальных факторов в микроокружении эмбрионов. Очевидно, что аналогичный подход может быть реализован, например, для церебральных органоидов и других мультиклеточных кластеров, воспроизводящих события, происходящие на ранних этапах развития центральной нервной системы, либо в микрофизиологических системах в формате «мозг-на-чипе».

Не менее интересным подходом является применение алгоритмов машинного

обучения для рационального дизайна экспериментов с применением протоколов оптогенетики. Примечательно, что применение этих алгоритмов может быть полезным для разработки новых оптогенетических инструментов с минимальной инвазивностью (отсутствие потребности в интракраниальной доставке вектора). Так, представленная в работе [6] модель обладает способностью весьма точно предсказывать свойства каналородопсинов (ChR) и конструировать новые варианты ChR с высокой фоточувствительностью и восприимчивых к свету разной длины волны, генерирующими фототоки с различными кинетическими характеристиками, экспрессирующимися при минимально инвазивной трансфекции. Это открывает новые возможности для использования проникающего в ткани инфракрасного излучения как стимулятора активности ChR. Более того, такая системная доставка вектора важна для целенаправленной экспрессии ChR в тех регионах мозга, которые трудно достижимы при хирургических манипуляциях, например, глубокие отделы мозга или ганглии. Причём такие свойства были подтверждены в поведенческих тестах на экспериментальных животных, экспрессирующих соответствующие варианты ChR в нейронах. Таким образом, алгоритмы машинного обучения оказались полезными для оптимизации структуры и свойств ChR, повышения качества, а также редуцирования побочных эффектов вектор-опосредованной экспрессии ChR в клетках центральной нервной системы.

В недавнем исследовании [26] было убедительно продемонстрировано, что объединение поведенческого тестирования с прямым высокочувствительным мониторингом уровня дофамина в *nucleus accumbens* мышей, машинным обучением, компьютерным моделированием и оптогенетическими манипуляциями является адекватным подходом для анализа поведенческих реакций,

вызванных изменением процессов секреции дофамина в центральной нервной системе. В частности, было показано, что алгоритмы машинного обучения выявляют соответствие паттерна центральной секреции дофамина и поведенческой реакции у экспериментальных животных.

Не менее интересными являются данные [32] о том, как можно комбинировать оптогенетическую стимуляцию нейрональных популяций с применением алгоритмов машинного обучения применительно к идентификации функциональных связей между медиальной перегородкой и гиппокампальными нейронами. Иными словами, построение регрессионной модели для описания взаимосвязи между параметрами стимуляции медиальной перегородки и электрофизиологическими характеристиками гиппокампальных нейронов позволило найти оптимальные параметры для оптогенетической стимуляции.

Другой подход был реализован в работе [47], в которой был разработан протокол т. н. функциональной селломики (functional cellomics), который может аннотировать функцию нейрональных сетей с высокой пропускной способностью и разрешением на уровне одной клетки. Этот подход базируется на применении биоинженерных технологий, сопряжённых с алгоритмами машинного обучения (Cre-Lox-рекомбинация и подбор вариантов её использования для получения оптимального результата в оптогенетическом протоколе).

С учётом результатов анализа способов оценки и повышения качества нейроповеденческого тестирования, изложенных выше, закономерен вопрос о том, насколько вообще возможно использовать поведенческое тестирование в качестве маркера тех или иных вмешательств в функционирование клеток центральной нервной системы, в т. ч. при таргетном воздействии, достигаемом, например, при применении протоколов

оптогенетики, хемогенетики, соногенетики, термогенетики и т. д. [4, 11, 24].

### **Оптогенетические протоколы в идентификации молекулярных механизмов регуляции поведения**

Методология применения оптогенетического контроля поведения животных является достаточно хорошо отработанной. Оптогенетика обладает рядом ключевых преимуществ, таких как адресная активация клеток, экспрессирующих фоточувствительные белки, высокое пространственное и временное разрешение при фотостимуляции ткани, отсутствие побочных эффектов, связанных с эндогенной экспрессией аналогичных фоточувствительных белков в клетках центральной нервной системы. Указанные возможности метода позволили ему стать «золотым стандартом» в исследованиях *in vivo*, ориентированных на изучение вклада отдельных клеточных популяций в сложные поведенческие акты [3, 11, 24, 48].

Например, фотостимуляция ChR2-экспрессирующих нейронов префронтальной коры у мышей (свет длиной волны 473 нм, 5 мсек, 1 мВт, 20 Гц) приводила к достоверному увеличению тревожности за счёт изменения баланса возбуждения и торможения (E/I balance) в префронтальной коре. Примечательно, что в этом исследовании все поведенческие тесты выполнялись в тёмную фазу суточного ритма (12 ч света, 12 ч темноты), что соответствует фазе активности у грызунов. Другим важным аспектом выполнения батареи поведенческих тестов явилось то, что авторы предусмотрели особенности моторных функций у мышей с Cre-Lox-рекомбинацией, использованной при генерации соответствующего фенотипа (Nex-Cre-мыши), что привело к необходимости адаптировать приподнятый крестообразный лабиринт (дополнить его низкими бортиками) для предотвращения спонтанного падения животных из открытых «рукавов» лабиринта. Авторы

также рекомендуют не пользоваться одним тестом для регистрации определённого вида поведения, а всегда дополнять его каким-либо иным тестом, ориентированным на детекцию аналогичного варианта поведения, что существенно повышает достоверность полученных данных. Кроме того, следует учитывать, какая линия животных максимально подходит для учёта конкретного вида поведения: C57Bl/6 мыши имеют низкий базовый уровень тревожности, тогда как BALB/cByJ мыши всегда демонстрируют большую тревожность и высокую чувствительность к действию анксиолитиков. Более того, трансгенные варианты обеих линий могут также отличаться по базальному уровню поведения, что затрудняет интерпретацию полученных результатов [5]. Этот пример демонстрирует, что интерпретация данных поведенческого тестирования может быть дополнена процедурами, составляющими основу оптогенетического протокола.

Не менее интересным является методический подход, сформулированный в недавней работе [18]: авторы применили комбинацию автоматизированного тренинга грызунов в тех же клетках, в которых они содержались ранее (с исключением вмешательства в ход обучения или эксперимента человека), с оптогенетическим протоколом (без использования оптоволокна) для стимуляции различных регионов головного мозга (средний мозг, стриатум), для регистрации такой сложной формы поведения, как принятие решения (decision-making behavior). Примечательно, что такой подход не только обеспечивает обучение животных с не меньшей эффективностью, чем это достигалось при манипуляциях, проводимых человеком, но и даст возможность эффек-

тивного картирования регионов головного мозга, вовлечённых в принятие решений. Ограничения к использованию такого подхода связаны с особенностями реализации феномена фотостимуляции или фотоингибирования в контексте целого региона головного мозга, что трудно достижимо.

Существенным преимуществом применения оптогенетического протокола для оценки сложных поведенческих паттернов является возможность использования фотостимуляции или фотоингибирования активности клеток головного мозга в конкретном регионе в различные периоды до и после тестирования, например, для идентификации значимости связей между нейронами различных регионов в динамике кодирования и сохранения памяти [23]. Кроме того, в результате оптогенетической стимуляции клеток, чья вовлечённость в конкретный поведенческий акт или процесс запоминания доказывается в процессе нейроповеденческого тестирования, происходит интенсификация соответствующего механизма нейрональной активности, что, например, было продемонстрировано в улучшении параметров запоминания у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера [34].

## **Заключение**

В целом, сочетание современных протоколов поведенческого тестирования с анализом факторов, влияющих на результаты, методов таргетной активации или ингибирования клеток головного мозга, а также технологий машинного обучения или автоматизации экспериментов, является эффективным инструментом поиска новых механизмов пластичности головного мозга в норме и при хронической нейродегенерации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Amaral-Júnior P.A., Mourão F.A.G., Amancio M.C.L., Pinto H.P.P., Carvalho V.R., Guarnieri L.d.O., Magalhães H.A., Moraes M.F.D. A custom microcontrolled and wireless-operated chamber for auditory fear conditioning. *Front. Neurosci.* 2019;13:1193. DOI: 10.3389/fnins.2019.01193.
2. Anderson David J., Perona P. Toward a science of computational ethology. *Neuron.* 2014;84(1):18–31. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.09.005.
3. Anpilov S., Shemesh Y., Eren N., Harony-Nicolas H., Benjamin A., Dine J., Oliveira V.E.M., Forkosh O., Karamihalev S., Hüttl R.-E., Feldman N., Berger R., Dagan A., Chen G., Neumann I.D., Wagner S., Yizhar O., Chen A. Wireless optogenetic stimulation of oxytocin neurons in a semi-natural setup dynamically elevates both pro-social and agonistic behaviors. *Neuron.* 2020;107(4):644e7–655.e7. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.05.028.
4. Aravanis A., Wang L., Zhang F., Meltzer L., Mogri M., Schneider B., Deisseroth K. An optical neural interface: In vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J. Neural Eng.* 2007;4(3):S143–S156. DOI: 10.1088/1741-2560/4/3/S02.
5. Berg L., Gerdey J., Masseck O.A. Optogenetic manipulation of neuronal activity to modulate behavior in freely moving mice. *J. Vis. Exp.* 2020;164. DOI: 10.3791/61023.
6. Bedbrook C.N., Yang K.K., Robinson J.E., Mackey E.D., Gradinaru V., Arnold F.H. Machine learning-guided channelrhodopsin engineering enables minimally invasive optogenetics. *Nature Methods.* 2019;16(11):1176–1184. DOI: 10.1038/s41592-019-0583-8.
7. Berger E., Magliaro C., Paczia N., Monzel A.S., Antony P., Linster C.L., Bolognin S., Ahluwalia A., Schwamborn J.C. Millifluidic culture improves human midbrain organoid vitality and differentiation. *Lab. Chip.* 2018;18(20):3172–3183. DOI: 10.1039/c8lc00206a.
8. Buchroithner B., Mayr S., Hauser F., Priglinger E., Stangl H., Santa-Maria A.R., Deli M.A., Der A., Klar T.A., Axmann M., Sivun D., Mairhofer M., Jacak J. Dual channel microfluidics for mimicking the blood-brain barrier. *ACS Nano.* 2021;15(2):2984–2993. DOI: 10.1021/acsnano.0c09263.
9. Coghlan S., Webber S., Carter M. Improving ethical attitudes to animals with digital technologies: The case of apes and zoos. *Ethics Inf. Technol.* 2021;23(4):825–839. DOI: 10.1007/s10676-021-09618-7.
10. de Chaumont F., Coura R.D.-S., Serreau P., Cressant A., Chabout J., Granon S., Olivo-Marin J.-C. Computerized video analysis of social interactions in mice. *Nat. Methods.* 2012;9(4):410–417. DOI: 10.1038/nmeth.1924.
11. Deng C., Yuan H., Dai J. Behavioral manipulation by optogenetics in the nonhuman primate. *Neuroscientist.* 2017;24(5):526–539. DOI: 10.1177/1073858417728459.
12. Donnarumma F., Prevede R., Maisto D., Fuscone S., Irvine E.M., van der Meer M.A.A., Kemere C., Pezzulo G. A framework to identify structured behavioral patterns within rodent spatial trajectories. *Sci. Rep.* 2021;11(1):468. DOI: 10.1038/s41598-020-79744-7.
13. Fan S., Dal Monte O., Chang S.W.C. Levels of naturalism in social neuroscience research. *iScience.* 2021;24(7):102702. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102702.
14. Gomez-Marin A., Paton J.J., Kampff A.R., Costa R.M., Mainen Z.F. Big behavioral data: Psychology, ethology and the foundations of neuroscience. *Nat. Neurosci.* 2014;17(11):1455–1462. DOI: 10.1038/nn.3812.
15. Gouveia K., Hurst J.L. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: The major role of non-aversive handling. *Sci. Rep.* 2017;7:44999. DOI: 10.1038/srep44999.
16. Guo J., Wang P., Sozen B., Qiu H., Zhu Y., Zhang X., Ming J., Zernicka-Goetz M., Na J. Machine learning-assisted high-content analysis of pluripotent stem cell-derived embryos *in vitro*. *Stem Cell Reports.* 2021;16(5):1331–1346. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.03.018.
17. Hånell A., Marklund N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Front. Behav. Neurosci.* 2014;8:252. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00252.
18. Hao Y., Thomas A.M., Li N. Fully autonomous mouse behavioral and optogenetic experiments in home-cage. *eLife.* 2021;10:e66112. DOI: 10.7554/eLife.66112.
19. Henderson L.J., Dani B., Serrano E.M.N., Smulders T.V., Roughan J.V. Benefits of tunnel handling persist after repeated restraint, injection and anaesthesia. *Sci. Rep.* 2020;10(1):14562. DOI: 10.1038/s41598-020-71476-y.
20. Henderson L.J., Smulders T.V., Roughan J.V. Identifying obstacles preventing the uptake of tunnel handling methods for laboratory mice: An international thematic survey. *PLoS One.* 2020;15(4):e0231454. DOI: 10.1371/journal.pone.0231454.
21. Hong W., Kennedy A., Burgos-Artizzu X.P., Zelikowsky M., Navonne S.G., Perona P., Anderson D.J. Automated measurement of mouse social behaviors using depth sensing, video tracking, and machine learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015;112(38):E5351–E5360. DOI: 10.1073/pnas.1515982112.
22. Kabra M., Robie A.A., Rivera-Alba M., Branson S., Branson K. JAABA: Interactive machine learning for automatic annotation of animal behavior. *Nat. Methods.* 2013;10(1):64–67. DOI: 10.1038/nmeth.2281.
23. Kang M.S., Han J.-H. Optogenetic inhibition of medial entorhinal cortex inputs to the hippocampus during a short period of time right after learning disrupts contextual fear memory formation. *Mol. Brain.* 2021;14(1):2. DOI: 10.1186/s13041-020-00719-w.

24. Kim S., Kyung T., Chung J.-H., Kim N., Keum S., Lee J., Park H., Kim H.M., Lee S., Shin H.-S., Do Heo W. Non-invasive optical control of endogenous Ca<sup>2+</sup> channels in awake mice. *Nat. Commun.* 2020;11(1):210. DOI: 10.1038/s41467-019-14005-4.
25. Kuchemüller K.B., Pörtner R., Möller J. Digital twins and their role in model-assisted design of experiments. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2021;177:29–61. DOI: 10.1007/10\_2020\_136.
26. Kutlu M.G., Zachry J.E., Melugin P.R., Cajigas S.A., Chevee M.F., Kelly S.J., Kutlu B., Tian L., Siciliano C.A., Calipari E.S. Dopamine release in the nucleus accumbens core signals perceived saliency. *Curr. Biol.* 2021;31(21):4748e8–4761.e8. DOI: 10.1016/j.cub.2021.08.052.
27. Lee J.-E., Kwon H.-J., Choi J., Seo J.-S., Han P.-L. Aging increases vulnerability to stress-induced depression via upregulation of NADPH oxidase in mice. *Commun. Biol.* 2020;3(1):292. DOI: 10.1038/s42003-020-1010-5.
28. Lewejohann L., Reinhard C., Schrewe A., Brandewiede J., Haemisch A., Görtz N., Schachner M., Sachser N. Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. *Genes Brain Behav.* 2006;5(1):64–72. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2005.00140.x.
29. Lopatina O.L., Panina Y.A., Malinovskaya N.A., Salmina A.B. Early life stress and brain plasticity: From molecular alterations to aberrant memory and behavior. *Rev. Neurosci.* 2021;32(2):131–142. DOI: 10.1515/revneuro-2020-0077.
30. Mencattini A., Mattei F., Schiavoni G., Gerardino A., Businaro L., Di Natale C., Martinelli E. From Petri dishes to organ on chip platform: The increasing importance of machine learning and image analysis. *Front. Pharmacol.* 2019;10:100. DOI: 10.3389/fphar.2019.00100.
31. Noldus L.P.J.J., Spink A.J., Tegelenbosch R.A.J. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput.* 2001;33(3):398–414. DOI: 10.3758/bf03195394.
32. Park S.-E., Laxpati N.G., Gutekunst C.-A., Connolly M.J., Tung J., Berglund K., Mahmoudi B., Gross R.E. A machine learning approach to characterize the modulation of the hippocampal rhythms via optogenetic stimulation of the medial septum. *Int. J. Neural Syst.* 2019;29(10):1950020. DOI: 10.1142/S0129065719500205.
33. Pasquet M.O., Tihy M., Gurgeon A., Pompili M.N., Godsil B.P., Léna C., Dugué G.P. Wireless inertial measurement of head kinematics in freely-moving rats. *Sci. Rep.* 2016;6:35689. DOI: 10.1038/srep35689.
34. Perusini J.N., Cajigas S.A., Cohensedgh O., Lim S.C., Pavlova I.P., Donaldson Z.R., Denny C.A. Optogenetic stimulation of dentate gyrus engrams restores memory in Alzheimer's disease mice. *Hippocampus.* 2017;27(10):1110–1122. DOI: 10.1002/hipo.22756.
35. Richter S.H. Automated home-cage testing as a tool to improve reproducibility of behavioral research? *Front. Neurosci.* 2020;14:383. DOI: 10.3389/fnins.2020.00383.
36. Richter S.H., Garner J.P., Zipser B., Lewejohann L., Sachser N., Touma C., Schindler B., Chourbaji S., Brandwein C., Gass P., van Stipdonk N., van der Harst J., Spruijt B., Vöikar V., Wolfer D.P., Würbel H. Effect of population heterogenization on the reproducibility of mouse behavior: A multi-laboratory study. *PLoS One.* 2011;6(1):e16461. DOI: 10.1371/journal.pone.0016461.
37. Salmina A.B., Gorina Y.V., Komleva Y.K., Panina Y.A., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L. Early life stress and metabolic plasticity of brain cells: Impact on neurogenesis and angiogenesis. *Biomedicines.* 2021;9(9):1092. DOI: 10.3390/biomedicines9091092.
38. Salmina A.B., Kharitonova E.V., Gorina Y.V., Teplyashina E.A., Malinovskaya N.A., Khilazheva E.D., Mosyagina A.I., Morgun A.V., Shuvaev A.N., Salmin V.V., Lopatina O.L., Komleva Y.K. Blood-brain barrier and neurovascular unit in vitro models for studying mitochondria-driven molecular mechanisms of neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(9):4661. DOI: 10.3390/ijms22094661.
39. Salmina A.B., Komleva Y.K., Malinovskaya N.A., Morgun A.V., Teplyashina E.A., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Kharitonova E.V., Khilazheva E.D., Shuvaev A.N. Blood-Brain barrier breakdown in stress and neurodegeneration: Biochemical mechanisms and new models for translational research. *Biochemistry (Mosc.)* 2021;86(6):746–760. DOI: 10.1134/S0006297921060122.
40. Saré R.M., Lemons A., Smith C.B. Behavior testing in rodents: Highlighting potential confounds affecting variability and reproducibility. *Brain Sci.* 2021;11(4):522. DOI: 10.3390/brainsci11040522.
41. Saxena D., Sharma A., Siddiqui H.M., Kumar R. Blood brain barrier permeability prediction using machine learning techniques: An update. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2019;20(14):1163–1171. DOI: 10.2174/1389201020666190821145346.
42. Smith J.D., Beran M.J., Couchman J.J., Coutinho M.V.C., Boomer J.B. Animal metacognition: Problems and prospects. *Comp. Cogn. Behav. Rev.* 2009;4:40–53. DOI: 10.3819/ccbr.2009.40004.
43. Sousa N., Almeida O.F.X., Wotjak C.T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav.* 2006;5(Suppl 2):5–24. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2006.00228.x.
44. von Ziegler L., Sturman O., Bohacek J. Big behavior: Challenges and opportunities in a new era of deep behavior profiling. *Neuropsychopharmacology.* 2021;46(1):33–44. DOI: 10.1038/s41386-020-0751-7.
45. Wahl D., Coogan S.C., Solon-Biet S.M., de Cabo R., Haran J.B., Raubenheimer D., Cogger V.C.,

- Mattson M.P., Simpson S.J., Le Couteur D.G. Cognitive and behavioral evaluation of nutritional interventions in rodent models of brain aging and dementia. *Clin. Interv. Aging.* 2017;12:1419–1428. DOI: 10.2147/CIA.S145247.
46. Wang M.F.Z., Fernandez-Gonzalez R. (Machine-) Learning to analyze in vivo microscopy: Support vector machines. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 2017;1865(11 Pt B):1719–1727. DOI: 10.1016/j.bbapap.2017.09.013.
47. Yamauchi Y., Matsukura H., Ueda M., Aoki W. Development of a novel sparse labeling method by machine learning-guided engineering of Cre-lox recombination. *FASEB J.* 2021;35(S1). DOI: 10.1096/fasebj.2021.35.S1.01974.
48. Yang Y., Wu M., Vázquez-Guardado A., Wegener A.J., Grajales-Reyes J.G., Deng Y., Wang T., Avila R., Moreno J.A., Minkowicz S., Dumrongprechachan V., Lee J., Zhang S., Legaria A.A., Ma Y., Mehta S., Franklin D., Hartman L., Bai W., Han M., Zhao H., Lu W., Yu Y., Sheng X., Banks A., Yu X., Donaldson Z.R., Gereau R.W., Good C.H., Xie Z., Huang Y., Kozorovitskiy Y., Rogers J.A. Wireless multilateral devices for optogenetic studies of individual and social behaviors. *Nat. Neurosci.* 2021;24(7):1035–1045. DOI: 10.1038/s41593-021-00849-x.

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Салмина Алла Борисовна**, д.м.н., проф., НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; Институт мозга, ФГБНУ «Научный центр неврологии»;

[e-mail: allasalmina@mail.ru](mailto:allasalmina@mail.ru)

**Горина Яна Валерьевна\***, к.фарм.н., доц., НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России;

[e-mail: yana\\_20@bk.ru](mailto:yana_20@bk.ru)

**Большакова Анастасия Викторовна**, к.б.н., ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»;

[e-mail: bolshakova.av@spbstu.ru](mailto:bolshakova.av@spbstu.ru)

**Власова Ольга Леонардовна**, д.ф.-м.н., доц., ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»;

[e-mail: vlasova.ol@spbstu.ru](mailto:vlasova.ol@spbstu.ru)

**Alla B. Salmina**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky of the Ministry of Health Care of Russia; Brain Institute, Research Center of Neurology;

[e-mail: allasalmina@mail.ru](mailto:allasalmina@mail.ru)

**Yana V. Gorina\***, Cand. Sci. (Pharm.), Assoc. Prof., Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky of the Ministry of Health Care of Russia;

[e-mail: yana\\_20@bk.ru](mailto:yana_20@bk.ru)

**Anastasia V. Bolshakova**, Cand. Sci. (Biol.), St. Petersburg Polytechnic University of Peter the Great;

[e-mail: bolshakova.av@spbstu.ru](mailto:bolshakova.av@spbstu.ru)

**Olga L. Vlasova**, Dr. Sci. (Phys.-Math.), Assoc. Prof., St. Petersburg Polytechnic University of Peter the Great;

[e-mail: vlasova.ol@spbstu.ru](mailto:vlasova.ol@spbstu.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ИССЛЕДОВАНИЕ СОПОСТАВИМОСТИ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИХ, ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕФЕРЕНТНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ПУЛЬМОЗИМ И БИОАНАЛОГИЧНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ТИГЕРАЗА

М.С. Аксёнова<sup>1</sup>, Е.Н. Бочарова<sup>1</sup>, С.Г. Аббасова<sup>1</sup>, А.С. Пономарёв<sup>2</sup>, В.В. Логинова<sup>1</sup>, М.В. Болотникова<sup>1</sup>, Н.В. Бельская<sup>1,\*</sup>, А.А. Казаров<sup>1</sup>, А.Е. Лисова<sup>1</sup>, Н.К. Кудина<sup>1</sup>, М.С. Пантюшенко<sup>1</sup>, М.В. Жилиева<sup>1</sup>, Д.С. Копеин<sup>1</sup>, Ю.М. Карелов<sup>2</sup>, Г.Г. Эрастов<sup>2</sup>, М.В. Лыков<sup>1</sup>, Р.А. Хамитов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> АО «ГЕНЕРИУМ»  
601125, Российская Федерация, Владимирская обл., Петушинский р-н,  
п. Вольгинский, Владимирская ул., 14Б

<sup>2</sup> ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России  
141306, Российская Федерация, Московская обл., Сергеево-Посадский г.о.,  
терр. Сергеев Посад-6, Октябрьская ул., 11

Представлены результаты исследований препарата Тигераза® (р-р для ингаляций, производитель АО «ГЕНЕРИУМ», Россия), проведённые для получения доказательств его подобности (сопоставимости) референтному препарату Пульмозим® (р-р для ингаляций, производитель «Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария). Оба препарата содержат в качестве действующего вещества человеческую рекомбинантную дезоксирибонуклеазу I — дорназу альфа, предназначены для лечения кистозного фиброза с лёгочными проявлениями (муковисцидоза). Изучена ферментативная активность дорназы альфа, содержащейся в изучаемых препаратах, *in vitro* и *ex vivo* на образцах гнойной мокроты больных. Изучены фармакокинетические параметры препаратов в сыворотке крови, бронхах и лёгких и основные физиологические показатели (масса и температура тела, состояние сердечно-сосудистой, дыхательной, выделительной систем, гематологические и биохимические параметры крови, патоморфологические изменения внутренних органов, включая состояние роговицы глаз, показатели смертности) в сравнительных исследованиях субхронической токсичности на ювенильных и половозрелых крысах при 28-дневном ингалировании в дозах 0,2 мг/кг половозрелым и 0,26 мг/кг ювенильным животным (доза в 6 раз превышала рекомендованную для клинического применения). Результаты исследований позволяют сделать вывод о сопоставимости препаратов по ферментативной, муколитической (секретолитической) ДНКазной активности, профилю безопасности и основным фармакокинетическим параметрам.

**Ключевые слова:** дорназа альфа, муковисцидоз, биоаналог, ДНКазная активность

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Аксёнова М.С., Бочарова Е.Н., Аббасова С.Г., Пономарёв А.С., Логинова В.В., Болотникова М.В., Бельская Н.В., Казаров А.А., Лисова А.Е., Кудина Н.К., Пантюшенко М.С., Жилиева М.В., Копеин Д.С., Карелов Ю.М., Эрастов Г.Г., Лыков М.В., Хамитов Р.А. Исследование сопоставимости фармакодинамических, токсикологических и фармакокинетических свойств референтного лекарственного препарата Пульмозим и биоаналогичного лекарственного препарата Тигераза. *Биомедицина*. 2023;19(1):47–60. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-47-60>

Поступила 11.08.2022

Принята после доработки 12.12.2022

Опубликована 10.03.2023

## COMPARABILITY OF THE REFERENCE DRUG PULMOZIM AND A SIMILAR DRUG TIGERASE IN TERMS OF THEIR PHARMACODYNAMIC, TOXICOLOGICAL AND PHARMACOKINETIC PROPERTIES

Maria S. Aksenova<sup>1</sup>, Eugenia N. Bocharova<sup>1</sup>, Svetlana G. Abbasova<sup>1</sup>,  
Alexander S. Ponomarev<sup>2</sup>, Valentina V. Loginova<sup>1</sup>, Maria V. Bolotnikova<sup>1</sup>,  
Nataliya V. Belskaya<sup>1,\*</sup>, Aleksander A. Kazarov<sup>1</sup>, Alena E. Lisova<sup>1</sup>, Nataliya K. Kudina<sup>1</sup>,  
Marina S. Pantyushenko<sup>1</sup>, Maria V. Zhilyaeva<sup>1</sup>, Damir S. Kopein<sup>1</sup>, Yuri M. Karelov<sup>2</sup>,  
Georgiy G. Erastov<sup>2</sup>, Maksim V. Lykov<sup>1</sup>, Ravil A. Chamitov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> AO "GENERIUM"

601125, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinskiy District,  
Vol'ginskiy Village, Vladimirskaaya Str., 14Б

<sup>2</sup> 48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of Russia

141306, Moscow Region, Sergiev Posad City District, Sergiev Posad-6 Territory, Oktyabrskaya Str., 11

This work presents research studies into the comparability of Tigerase® (inhalation solution, manufactured by JSC «GENERIUM», Russia) to the reference drug Pulmozim® (inhalation solution, manufactured by Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland). Both drugs contain human recombinant deoxyribonuclease I – dornase alpha as an active substance and are intended for the treatment of cystic fibrosis with pulmonary manifestations (cystic fibrosis). The specific enzymatic activity of dornase alpha was studied *in vitro* and *ex vivo* using samples of patients' purulent sputum. The pharmacokinetic parameters of the drugs were studied in the blood serum, bronchi and lungs. The main physiological parameters (body weight and temperature, the state of the cardiovascular, respiratory, excretory systems, hematological and biochemical blood parameters, pathomorphological changes in the internal organs, including the state of the cornea of the eyes, mortality rates) were assessed in comparative studies of subchronic toxicity in juvenile and sexually mature rats using 28-day inhalation in doses of 0.2 mg/kg to sexually mature and 0.26 mg/kg to juvenile animals (the dose was 6 times higher than the recommended dose for clinical use). It was concluded that the drugs were comparable in terms of their enzymatic, mucolytic (secretolytic) DNase activity, safety profile, and basic pharmacokinetic parameters.

**Keywords:** dornase alfa, cystic fibrosis, biosimilar, DNase activity

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

**For citation:** Aksenova M.S., Bocharova E.N., Abbasova S.G., Ponomarev A.S., Loginova V.V., Bolotnikova M.V., Belskaya N.V., Kazarov A.A., Lisova A.E., Kudina N.K., Pantyushenko M.S., Zhilyaeva M.V., Kopein D.S., Karelov Y.M., Erastov G.G., Lykov M.V., Chamitov R.A. Comparability of the Reference Drug Pulmozim and a Similar Drug Tigerase in Terms of their Pharmacodynamic, Toxicological and Pharmacokinetic Properties. *Journal Biomed.* 2023;19(1):47–60. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-47-60>

Submitted 11.08.2022

Revised 12.12.2022

Published 10.03.2023

### Введение

Кистозный фиброз (муковисцидоз, МВ) — наследственное (аутосомно-рецессивное) хроническое заболевание, характеризующееся поражением экзокринных желёз и жизненно важных органов и систем, вызвано дисфункцией цАМФ-зависимого хлорно-

го канала вследствие мутации гена *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) [22], физиологическая роль которого заключается в регуляции транспорта электролитов (главным образом, ионов хлора) между эпителиальными клетками выводных протоков желёз внешней секре-

ции (потовых, слюнных, желёз в бронхах, поджелудочной железе, кишечнике, урогенитальном тракте) и внеклеточным матриксом [10]. Мутации гена *CFTR* вызывают затруднение выхода ионов хлора через канал и, как следствие, увеличение реабсорбции натрия и дегидратацию секрета, делая его более вязким и густым [3]. Затруднённый отток бронхиального секрета у более чем 90% пациентов с МВ приводит к хроническому поражению дыхательных путей. В России в 2019 г. имелось более 3000 пациентов с МВ, их средний возраст составлял  $13,2 \pm 9,8$  года, доля пациентов старше 18 лет — 25,5% [7].

Одним из препаратов для лечения кистозного фиброза с лёгочными проявлениями (муковисцидоза) и других заболеваний нозологической группы МБК-10 [6] является препарат Пульмозим® (Pulmozyme®, р-р для ингаляций, производства «Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария) — отхаркивающее муколитическое средство.

Муковисцидоз (МВ) относится к социально значимым заболеваниям, поскольку частота встречаемости этой наследственной болезни очень высокая (по разным оценкам, от 1:3500 до 1:12000), проявляется в самом раннем возрасте, и её лечение является существенным социально-экономическим бременем [4]. Тигераза® — лекарственный препарат в форме р-ра для ингаляций производства АО «ГЕНЕРИУМ», содержащий в качестве действующего вещества человеческую рекомбинантную дезоксирибонуклеазу I — дорназу альфа (код CAS 9003-98-9), разрабатывался как биоаналог Пульмозима®. Следует отметить, что разработка биоаналогов в настоящее время переросла в самостоятельную отрасль, поскольку стоимость и длительность её существенно ниже, чем оригинальных биотехнологических лекарственных средств [2, 14]. Однако создание биоаналогов, несмотря на кажущуюся простоту, является очень сложным технологическим

процессом, а подтверждение сопоставимости их свойств с референтным препаратом строго регламентируется [12, 14, 19].

Данное исследование выполнено в соответствии с существующими международными нормами, предъявляемыми к исследованиям, доказывающим подобность (сопоставимость) свойств биоаналога и референтного препарата [15, 16, 17].

**Цель работы** — доказать сопоставимость фармакологической активности и безопасности лекарственного препарата Тигераза® производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Россия) и референтного препарата Пульмозим® производства «Хоффманн-Ля Рош Лтд.» (Швейцария).

## Материалы и методы

### Исследуемые вещества

Лекарственные формы дорназы альфа производства АО «ГЕНЕРИУМ», Россия (Тигераза®, далее по тексту — Д-Т, опыт) и производства «Хоффманн-Ля Рош Лтд.», Швейцария (Пульмозим®, далее по тексту — Д-П, контроль-2), плацебо (контроль-1) — фосфатно-солевой буфер на основе натрия хлорида, кальция хлорида дигидрата (вспомогательные вещества препарата Тигераза®).

### Определение специфической активности дорназы альфа

Последовательные разведения стандартного (Д-П) и испытуемого (Д-Т) образцов (от 0,0055 до 50 мкг/мл) в буферном р-ре (25 мМ НЕРЕС, 5,4 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 4 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,01%  $\text{NaN}_3$  и 0,05% полисорбата 20,  $\text{pH}=7,5$ ) помещали в планшеты из несорбирующего пластика и добавляли субстрат (комплекс ДНК-метиловый зелёный), инкубировали 4 ч ( $37^\circ\text{C}$ ) и измеряли оптическую плотность. Для расчёта полумаксимальной эффективной концентрации ингибирования ( $\text{IC}_{50}$ ) находили разницу значений оптической плотности при длине волны 620 и 492 нм и вычитали среднее

значение оптической плотности буферного р-ра, затем строили кривую зависимости оптической плотности от логарифма концентрации с использованием 4-параметрической логистической модели (коэффициент достоверности аппроксимации не менее 0,95) и определяли  $IC_{50}$ . Специфическую активность испытуемого образца вычисляли по формуле:  $АСО \times (IC_{50 \text{ Д-П}} / IC_{50 \text{ Д-Т}})$ , где АД-П — активность стандартного образца,  $IC_{50 \text{ Д-П}}$  и  $IC_{50 \text{ Д-Т}}$  — полумаксимальные эффективные концентрации ингибирования стандартного (Д-П) и испытуемого (Д-Т) образцов.

#### **Определение муколитической активности дорназы альфа *ex vivo***

Образцы мокроты собирали у детей в возрасте от 2 до 16 лет с хроническими заболеваниями лёгких (в ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии» ФМБА), замораживали и хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . Непосредственно перед измерением образцы мокроты размораживали и объединяли в общий пул (от 10 пациентов). К 0,5 мл пулированного образца добавляли 10 мкл р-ра Д-Т или Д-П (в буферном р-ре 150 мМ NaCl, 1,35 мМ CaCl<sub>2</sub>), инкубировали 15 мин при  $37^\circ\text{C}$  и измеряли вязкость смеси на вискозиметре Брукфильда DV2TLV с использованием шпинделя CPA-52Z (при скорости вращения шпинделя 1 об./мин). Результаты представляли в мПа·сек.

#### **Животные**

Исследование проводили на половозрелых и ювенильных аутбредных крысах (*Rattus* sp.) обоего пола стока Sprague-Dawley (CD) в возрасте на начало исследования 3–4 и 8–9 недель с массой тела ювенильных животных около 50 г, половозрелых — 190–220 г (самки) и 290–320 г (самцы), всего 102 половозрелых и 332 ювенильных особей. Использование ювенильных животных связано с тем, что основная часть пациентов — дети. Все животные SPF-статуса, поставщик — Питомник лабо-

раторных животных «Пушино» ФИБХ РАН. Животных содержали группами в индивидуально вентилируемых клетках из расчёта 200–250 см<sup>2</sup> пола клетки на 1 животное, обеспечивая свободный доступ к воде и корму. Корм «ЧАРА» для разведения лабораторных животных SPF-категории (ООО «Ассортимент Агро») и «ВАКА» (ООО «БИОСФЕРА») перед раздачей автоклавировали. Для поения использовали воду, прошедшую подготовку в обратно-осмотической установке и обработанную УФ (ЗАО «Научно-производственная компания Медиана-Фильтр»), разлитую в про-автоклавируемые бутылочки. В качестве подстила использовали автоклавированную смесь подстила «Золотой Кот» (ООО «ЗКК «Золотой Почагок», Россия) и «Safe®» (J. Rettenmaier & Sohne GmbH, Германия) в соотношении 1:4. После приёма животные проходили адаптацию в течение 5 дней, в начале и в конце адаптации проводили клинический осмотр. Распределение животных по группам осуществляли случайным образом, но так, чтобы индивидуальная масса животных в группе не отличалась от средней массы животных одного пола более чем на 10%. Состояние животных в эксперименте оценивали ежедневно по следующим показателям: состояние шерсти и кожи; наличие/отсутствие выделений из естественных отверстий; активность/сон; движения (нормальные, аномальные); потребление корма/воды; состояние фекалий (консистенция, количество); реакция на руки (беспокойство, любопытство, вокализация); тургор кожи и состояние видимых слизистых оболочек. Эвтаназию проводили ингаляцией углекислым газом (основной метод) с последующим обескровливанием (вспомогательный метод).

#### **Ингаляционное введение, дозы**

Ингаляционную камеру (0,6×0,6×0,5 м из нержавеющей стали с клапаном для компенсации внутреннего давления) соединяли с небулайзером «Pari LC Sprint» с компрес-

сором «Pari Boy SX» (PARI GmbH, Германия) и пробоотборником, размещали внутри камеры животных и распыляли вещества. В предварительных экспериментах (выполнены в ФГБУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ», г. Сергиев Посад) установлено, что аэрозоль в камере достигал равновесного значения через 10 мин после начала его продуцирования, по размеру частиц являлся стабильным во времени и однородным по объёму камеры, массовый медианный аэродинамический диаметр и размер частиц аэрозоля обоих препаратов идентичны, средняя массовая концентрация генерируемого аэрозоля составляла 4,0 мг/л и сохранялась на этом уровне в течение всего времени экспозиции. Контроль массовой концентрации аэрозоля и массовый медианный аэродинамический диаметр при ингаляции животным проводили через 20, 30, 40 и 50 мин валидированной методикой с использованием спектрофлуориметра CM 2203 («Solar», Белоруссия). Исследуемые вещества (Д-Т или Д-П) животным вводили в дозах 0,2 мг/кг (половозрелые) и 0,26 мг/кг (ювенильные) животные (время экспозиции в камере составляло 55 и 70 мин соответственно). Данные дозы более чем 6-кратно превышали рекомендуемую для клинического применения. Плацебо ингалировали аналогично — по 55 и 70 мин.

### Дизайн исследования

Формировали по три группы (плацебо, Д-Т и Д-П) половозрелых и ювенильных животных, препараты вводили ингаляционно 1 раз в день в течение 28 дней. На протяжении всего исследования животных ежедневно осматривали, еженедельно взвешивали и измеряли температуру тела, каждые две недели оценивали физиологические параметры, проводили общие анализы мочи и крови, определяли биохимические показатели крови. Часть животных эвтаназируют и вскрывали на 29-й день (через 1 сут после последнего введения), оставшихся —

на 57-й день (через 28-дневный период восстановления). Перед эвтаназией проводили офтальмоскопию. При вскрытии оценивали наличие изменений внутренних органов и тканей. Для изучения фармакокинетики кровь отбирали после первого и последнего (28-го) введения через 5 мин, 2, 8 и 24 ч после окончания ингаляции. На 29-й и 57-й день животных эвтаназировали и отбирали лёгкие и кровь, в которых измеряли содержание дорназы альфа. Для изучения иммуногенности кровь отбирали по окончании введения (29-й и 57-й день) и определяли в ней антилекарственные антитела (АЛА).

### Количественное определение

#### содержания дорназы альфа в образцах

Лёгкие разделяли на верхушечную и срединную части, отделяли и взвешивали бронхи и фрагменты лёгочной ткани; кровь центрифугировали и отделяли сыворотку. Образцы сыворотки, бронхов и лёгких замораживали и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Через 6–12 ч образцы лёгких гомогенизировали в ледяной бане в калий-фосфатном буферном р-ре (50 мМ однозамещённый фосфат калия тригидрат, двузамещённый фосфат калия моногидрат, рН=6,5), центрифугировали (13 000 об./мин, 15 мин,  $4^{\circ}\text{C}$ ), собирали надосадочную жидкость, в которой определяли содержание дорназы альфа. Сыворотку перед анализом разбавляли в 5 раз холодным калий-фосфатным буферным р-ром. Количественное содержание дорназы альфа в гомогенатах образцов лёгких и бронхов и сыворотке определяли с помощью оригинальной методики (валидацию проводили в соответствии с руководством [13]) со следующими валидационными характеристиками: диапазон устойчивой градуировочной кривой — 0,156–20 нг/мл, нижний предел количественного определения (НПКО) — 0,4 нг/мл, аналитический диапазон — 0,4–200 нг/мл, минимально необходимое разведение образца — 1/5. Крысиные антитела к дорназе альфа иммобилизовали в лунках 96-луночного ИФА-

планшета, удаляли не связавшиеся с пластиком антитела, блокировали свободные центры связывания пластика буферным р-ром PBST (0,01 М фосфатно-солевой буфер с 0,0137 моль/л NaCl, 0,0027 моль/л KCl, 0,05% полисорбата 20, pH=7,2–7,4), содержащим 1,0% бычьего сывороточного альбумина, инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С, и после отмывки добавляли разведённые образцы и градуировочные р-ры. После инкубации (1 ч, 37 °С) лунки 5 раз промывали PBST и добавляли конъюгированные с пероксидазой хрена крысиные поликлональные антитела к дорназе альфа, инкубировали (1 ч, 37 °С) и после отмывки вносили хромогенный субстрат пероксидазы хрена ТМБ. Инкубировали в темноте 15 мин (15–25 °С), останавливали реакцию добавлением 2 М р-ра серной кислоты и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм (спектрофотометр xMark, «Bio-Rad», США). Содержание дорназы альфа в образцах определяли с помощью градуировочной кривой зависимости оптической плотности (ОП) от десятичного логарифма концентрации дорназы альфа с использованием программного обеспечения Microplate Manager, v. 6.1 (xMark, «Bio-Rad», США).

### **Определение антилекарственных антител (АЛА)**

АЛА (антитела к дорназе альфа) в крови определяли по оригинальной валидированной методике иммуноферментного анализа (валидацию проводили в соответствии с рекомендациями [21] и руководством [13]). Образцы крови центрифугировали, отделяли сыворотку и определяли содержание АЛА в три последовательных этапа: 1 — скрининг, 2 — подтверждающий тест положительных в скрининге образцов, 3 — определение титра общих АЛА. В лунках ИФА-планшетов иммобилизовали Д-Т (0,5 мкг на лунку), блокировали свободные центры связывания пластика буферным р-ром PBST, содержащим 1,0% бычь-

его сывороточного альбумина, и отмывали р-ром PBST. Подготовленные таким образом планшеты использовали при проведении скрининга, подтверждающего теста и определении титра антител, для чего в лунки вносили разведённые образцы, инкубировали 1 ч (25 °С), трижды отмывали лунки PBST и вносили антикрысиные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, инкубировали 50 мин (25 °С), после отмывки добавляли хромогенный субстрат пероксидазы хрена ТМБ, инкубировали в темноте 5 мин (15–25 °С), останавливали реакцию добавлением 0,5 М р-ра серной кислоты и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм с использованием планшетного спектрофотометра (xMark, «Bio-Rad», США). Результат скрининга считали положительным, если среднее значение оптической плотности лунок с образцом, делённое на оптическую плотность буферного р-ра, использованного для разведения образцов, составляло не менее 1,6. Наличие АЛА верифицировали подтверждающим тестом, для чего образцы разводили в 100 раз подтверждающим р-ром № 1, содержащим дорназу альфа в качестве специфичного антигена, и подтверждающим р-ром № 2, содержащим рекомбинантную имиглюцеразу в качестве неспецифичного антигена, и буферным р-ром для разведения. По окончании анализа рассчитывали коэффициенты K1 и K2 по формулам:

$$K1 = \frac{OD_{\text{обр}}}{OD_{K1}}; \quad K2 = \frac{OD_{\text{обр}}}{OD_{K2}}$$

где  $OD_{K1}$  — среднее значение ОП образца при его разведении подтверждающим р-ром № 1;  $OD_{K2}$  — среднее значение ОП образца при его разведении подтверждающим р-ром № 2;  $OD_{\text{обр}}$  — среднее значение ОП образца при его разведении буферным р-ром.

Результаты оценивали следующим образом:

– если  $K1 > 1,6$ ,  $K2 \leq 1,6$ , то наличие АЛА подтверждено;

– если  $K1 \geq 1,6$ ,  $K2 \geq 1,6$ , то наличие АЛА не подтверждено (повышение сигнала не специфично);

– если  $K1 \leq 1,6$ ,  $K2 \leq 1,6$ , то наличие АЛА не подтверждено (повышение сигнала не специфично).

После подтверждения наличия антител к дорназе альфа определяли их титр, за титр принимали последнее разведение образца, при котором значение коэффициента  $K1$  составляло не менее 1,6.

#### **Физиологические и клинические исследования животных**

Температуру тела измеряли ректально термометром электронным WT-04 standart. Оценку физиологических параметров производили с использованием аппарата для электрофизиологических исследований MP150WSW («BIOPAC Systems, Inc.», США): артериальное давление (АД) измеряли неинвазивным способом (модуль NIBP200A и датчик-манжета RXTC-UFSSENSOR), частоту дыхательных движений (ЧДД) измеряли наложением датчика пневмографии TSD110 на грудную клетку (модуль RSP100C), частоту сердечных сокращений (ЧСС) и уровень сатурации крови ( $SpO_2$ ) определяли неинвазивно при помощи модуля OXY200 и датчика пульсоксиметрии TSD270B. Полученные при помощи аппарата MP150WSW данные обрабатывали прилагаемой к нему программой AcqKnowledge® («BIOPAC Systems, Inc.», США).

Оценку состояния роговицы глаз у животных проводили с использованием бинокулярной щелевой лампы «SHINN-NIPPON» (10×), состояние обоих глаз оценивали по наличию или отсутствию повреждения роговицы и признаков конъюнктивита с использованием прижизненной окраски поверхности роговицы (1% р-ром флюоресцеина натрия). Гематологический анализ проводили с использованием ав-

томатического гематологического анализатора Abacus Junior 5 Vet («Diatron», Австрия). Биохимические показатели крови (креатинин, ЛДГ, щелочная фосфатаза, глюкоза, общий билирубин, мочевина, холестерин, АЛТ, АСТ, общий белок) оценивали при помощи автоматического биохимического анализатора ChemWell 2900 (Т) («Awareness», США). Анализ мочи проводили с использованием тест-полосок COMBINA 13 на мочевом анализаторе Combilyzer 13 («HUMAN GmbH», Германия).

#### **Патоморфологические исследования**

При вскрытии проводили макроскопическое исследование внутренних органов грудной и брюшной полостей — селезёнки, печени, надпочечников, почек, сердца, лёгкие взвешивали. Для гистологического анализа отбирали образцы тонкой и толстой кишки, селезёнки, печени, почек, сердца, лёгких, лимфатических узлов (брыжейки и шейных), пищевода, трахеи, бронхов, роговицы глаза, а также органы, в которых выявлены макроскопические изменения. После фиксации формалиновым буфером образцы обезвоживали на станции гистологической проводки Leica TP 1020, заливали в парафин на станции заливки парафином Leica EG 1150 H, изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм на микротоме Thermo Microm HM 340 E, окрашивали гематоксилином-эозином. Оценку изменений производили с использованием микроскопа Leica DM4000.

#### **Методы статистической обработки данных**

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое ( $\bar{x}$ ), стандартную ошибку среднего ( $s$ ) либо среднеквадратическое отклонение ( $\sigma$ ). Обработку данных производили с использованием программ SPSS STATISTICS и Graphpad Prism 6.0. Значимость различий показателей средних в группах определяли с использованием критериев t-Стьюдента.

та, Фишера, Уилкоксона–Манна–Уитни. Сравнение параметров функций проводили с использованием критерия Фишера для добавочной суммы квадратов. Межгрупповое сравнение количества особей, выработавших АЛА, проводили по точному критерию Фишера. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследований

### Фармакологическая активность

Известно, что для оценки эффективности терапии муковисцидоза адекватных биологических моделей пока не разработано [8, 20], поэтому исследование фармакологической активности дорназы альфа проводили двумя методами: 1 — *in vitro* по ферментативной активности со стандартным субстратом (комплекс ДНК-метиленовый зелёный) и 2 — *ex vivo*, по способности снижать вязкость гнойной мокроты больных МВ [9]. Результаты анализа ферментативной активности трёх серий препаратов, выполненного в трёх повторностях, показали, что среднее значение величины ЕС50 составило  $28,66 \pm 0,73$  мкг/мл для Д-Т и  $28,24 \pm 0,34$  мкг/мл для Д-П. Дорназа альфа дозозависимо снижала вязкость мокроты (зависимость нелинейная), значимых различий между происхождением фермента и его муколитической (секретолитической) активностью не наблюдали (в табл. 1

представлены усреднённые результаты, полученные на трёх сериях препаратов).

### Субхроническая токсичность

В течение 28-дневного ингаляционного введения гибели животных и клинических признаков нарушения здоровья не наблюдали, одно животное было выведено на 42-й день по причине наличия признаков бактериальной инфекции.

Животные набирали вес в пределах своей физиологической нормы, по динамике массы тела в период введения (6–7-й, 13–14-й, 20–21-й и 27–28-е дни) и по окончании введения (на 34-й, 41–42-й, 48–49-й и 55–56-й дни) различий между группами, получавшими плацебо и препараты, не выявили. Физиологические (температура тела, ЧСС, ЧДД, АД,  $SpO_2$ ) и гематологические показатели половозрелых и ювенильных животных в период введения (14-й, 27-й день) и по окончании введения (42-й и 56-й день) не отличались от показателей, полученных до начала введения, не отмечено также различий по изученным показателям между группами, получавшими дорназу альфа (Д-Т или Д-П) и плацебо, как и между группами Д-Т и Д-П. Биохимические показатели крови половозрелых животных в середине и в конце периода введения (14-й и 27-й день) не отличались от полученных до начала введения, а также не было различий между группами, получавшими Д-Т,

**Таблица 1.** Вязкость образцов мокроты (мПа × сек) после инкубации с различными разведениями препаратов дорназы альфа производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Д-Т) и Хоффманн-Ля Рош Лтд. (Д-П)

**Table 1.** Sputum sample viscosity (MPa × sec) after incubation with the dornase alpha produced by АО “GENERIUM” (D-T) and Hoffmann-La Roche Ltd. (D-P)

Концентрация дорназы альфа, мкг/мл мокроты	Исследуемое вещество		Соотношение вязкости Д-Т/Д-П
	Д-Т	Д-П	
0	5565±490	5750±630	0,968
1	5029±365	5303±410	0,948
2	5007±320	5204±181	0,962
5	1612±250	1524±340	1,058
10	24±10	27±12	0,889
20	19±6	19±5	1,000

Д-П или плацебо как в период введения, так и после него (42-й и 56-й день). Некоторые биохимические показатели крови ювенильных животных, получавших Д-Т или Д-П, отличались от начального уровня (до начала введения): отмечено снижение содержания в сыворотке крови белка (29-й день), снижение активности ЩФ (29-й и 57-й день), повышение содержания креатинина (самцы, 29-й день), увеличение активности АЛТ (самцы, 29-й день), снижение содержания глюкозы (57-й день). При этом различий с показателями группы плацебо не было. В моче животных, получавших дорназу альфа (14-й, 28-й, 42-й и 56-й день), не наблюдали изменений по сравнению с соответствующими показателями до начала введения. Также по данным показателям не различались группы животных, получавших дорназу альфа разных производителей. На следующий день после окончания ингаляций (29-й день) и позже (57-й день) признаков конъюнктивита не выявлено, однако обнаружены поверхностные дефекты роговицы. По количеству дефектов роговицы различий между животными, получавшими Д-Т или Д-П, не зафиксировано. Не было различий между группой плацебо и животными, получавшими препараты дорназы альфа.

При некропии животных (половозрелых и ювенильных) всех групп по окончании 28-дневного введения (29-й и 57-й день) макроскопических изменений внутренних органов, которые могли быть вызваны препаратами, не обнаружено. Введение препаратов не оказало влияния на массу внутренних органов животных (селезёнку, печень, почки, надпочечники, сердце, правое и левое лёгкое), взятых на следующий день после окончания ингаляций и через 28 дней (57-й день эксперимента), различий массовых характеристик между животными, получавшими дорназу альфа разных производителей, не наблюдалось. При гистологическом исследовании

лёгких, бронхов, трахеи ювенильных животных, получавших препараты или плацебо, патоморфологических изменений не выявлено; у половозрелых крыс отмечали утолщение стенок альвеол и выход экссудата в область альвеол как на следующий день после окончания курса введения, так и 28 дней спустя. При гистологическом исследовании пищевода, тонкой и толстой кишки, сердца, селезёнки, шейных и брыжеечных лимфатических узлов ювенильных и половозрелых животных патологических изменений не выявлено. У некоторых ювенильных животных, вскрытых сразу после окончания введения, выявлено подкисление цитоплазмы некоторых канальцев в почках (ацидоз): у 1 самца группы плацебо, у 1 самки и 3 самцов группы Д-Т, у 1 самки в группе Д-П, через 28 дней после последнего введения эти изменения не наблюдали. У некоторых половозрелых животных наблюдали начальную стадию зернистой дистрофии печени, однако частота встречаемости данного отклонения одинакова во всех группах. У части ювенильных крыс, вскрытых сразу по окончании введения, выявлены отёки в цитоплазме гепатоцитов — гидропическая дистрофия: в группе плацебо — у 6 самок и 5 самцов; в группе Д-Т — у 3 самок и 3 самцов, в группе Д-П — у 4 самок и 3 самцов. Однако через 28 дней после последнего введения эти изменения исчезали. При исследовании морфологии роговицы глаза изменений в структуре не выявлено, у некоторых животных встречалась повышенная митотическая активность, свидетельствующая о регенеративных процессах в роговице, однако по частоте встречаемости группы не различались.

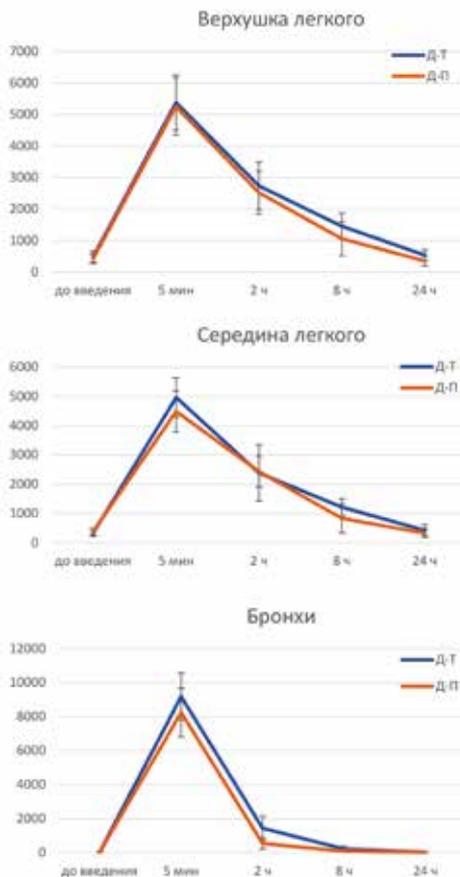
#### **Фармакокинетические параметры**

Содержание дорназы альфа в сыворотке крови половозрелых и юных животных через 5 мин, 2 ч и 8 ч после окончания первой и последней (28-й) ингаляции во всех группах оказалось ниже НПКО (0,4 нг/мл).

В лёгких (верхушка и середина) и бронхах половозрелых крыс через сутки после последнего (28-го) ингаляционного введения препаратов содержание дорназы альфа находилось в следующих диапазонах: у самок — от  $486 \pm 304$  до  $658 \pm 269$  нг/г ткани, у самцов — от  $634 \pm 392$  до  $829 \pm 184$  нг/г ткани; в группе плацебо: у самок — 6–7, у самцов — 10–14 нг/г ткани. Группы Д-Т и Д-П по содержанию дорназы альфа значимо не различались. У ювенильных крыс в эти же сроки в лёгких содержание дорназы альфа было близко к показателям половозрелых животных, сравнение в разные временные точки (5 мин, 2 и 8 ч после первой ингаляции) показало, что максимум приходился на срок 5 мин после начала ингаляции (в верхушке лёгкого — 4093–4561, в середине лёгкого — 3415–3600 нг/г ткани). Результаты определения содержания дорназы альфа в лёгких и бронхах ювенильных животных до начала 28-й ингаляции и через 5 мин, 2, 8 и 24 ч после неё представлены на рисунке. На основании полученных данных были рассчитаны фармакокинетические параметры: содержание дорназы альфа снижалось существенно быстрее в бронхах (период полувыведения  $T_{1/2}$  составлял 3–4 ч) в сравнении с верхушкой и серединой лёгкого (период полувыведения — 10–11 и 8–10 ч соответственно). При этом накопление препарата, оценённое по  $St_{ax}$  и  $AUC_{0-t}$ , отмечено в бронхах (индексы накопления по  $St_{ax}$  — около 5–6, по  $AUC_{0-t}$  — около 3–4) и практически не выражено для верхушки и середины лёгкого (индексы накопления — около 1). Данные эффекты значимо не отличаются между группами Д-Т и Д-П.

### Иммуногенность

У юных животных при скрининге АЛА не обнаружены, у половозрелых животных обнаружены во все сроки наблюдения (табл. 2), за исключением дня накануне начала ингаляций. На 14-й день их титр во всех группах составлял 1/10–1/20, в кон-



**Рис.** Содержание дорназы альфа (нг/г ткани) в лёгких и бронхах ювенильных крыс до начала 28-й ингаляции и через 5 мин, 2, 8 и 24 ч после ингаляции плацебо и препаратов дорназы альфа производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Д-Т) или «Хоффманн-Ля Рош Лтд.» (Д-П): по оси абсцисс — время отбора ткани, по оси ординат — содержание дорназы альфа.

**Fig.** The content of dornase alpha (ng/g of tissue) in the lungs and bronchi of juvenile rats before and after the 28th inhalation (5 minutes, 2, 8 and 24 hours) of dornase alpha produced by AO "GENERIUM" (D-T) or Hoffmann-La Roche Ltd. (D-P): abscissa axis – the time of sampling, ordinate axis – the content of dornase alpha.

це периода введения (28-й день) повышался до 1/80, а через 14 и 28 дней после окончания введений в каждой группе только по одной крысе имели титр АЛА более 1/80.

**Таблица 2.** Количество половозрелых животных (суммарно самок и самцов) с АЛА в сыворотке крови и титр АЛА в разные сроки ингаляционного введения плацебо, препаратов дорназы альфа производства АО «ГЕНЕРИУМ» (Д-Т) или «Хоффманн-Ля Рош Лтд.» (Д-П)

**Table 2.** Number of mature rats (total females and males) with ALA in blood serums and ALA titers after inhalation of dornase alpha medical products manufactured by AO "GENERIUM" (D-T) or "Hoffmann-La Roche Ltd." (D-P)

День эксперимента	Вводимое вещество		
	Плацебо	Д-Т	Д-П
14-й день введения	0 (n=24)	1 (4,2%, n=24) 1:20 y 1 (100%)	3 (12,5%, n=24) 1:10 y 1 (33,3%) 1:20 y 2 (66,7%)
28-й день введения	0 (n=24)	7 (29,2%, n=24) 1:20 y 1 (14,3%) 1:40 y 1 (14,3%) 1:80 y 5 (71,4%)	8 (33,3%, n=24) 1:20 y 2 (25,0%) 1:40 y 1 (12,5%) 1:80 y 5 (62,5%)
42-й день (14 дней по окончании введения)	0 (n=12)	7 (58,3%, n=12), 1:10 y 2 (28,6%) 1:20 y 2 (28,6%) 1:80 y 2 (28,6%) >1:80 y 1 (14,3%)	8 (66,7%, n=12) 1:10 y 1 (12,5%) 1:80 y 2 (25,0%) >1:80 y 1 (12,5%)
56-й день (28 дней по окончании введения)	0 (n=12)	5 (41,7%, n=12) 1:10 y 2 (40,0%) 1:40 y 1 (20,0%) 1:80 y 1 (20,0%) >1:80 y 1 (20,0%)	4 (33,3%, n=12) 1:10 y 1 (25,0%) 1:40 y 1 (25,0%) 1:80 y 1 (25,0%) >1:80 y 1 (25,0%)

## Обсуждение результатов

Ферментативная и муколитическая (секретолитическая) активность дорназы альфа производства АО «ГЕНЕРИУМ» была сопоставима с таковой производства «Хоффманн-Ля Рош Лтд.». Ингаляционное 28-дневное введение препаратов в дозе, 6-кратно превышающей рекомендуемую для клинического использования, хорошо переносилось животными (как ювенильными, так и взрослыми), не вызывало гибели и изменений со стороны сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной и выделительной систем животных. У половозрелых животных всех групп, включая плацебо, выявлено утолщение стенок альвеол и выход экссудата в область альвеол. Трактовать данные изменения как альвеолит достаточных оснований нет, хотя наличие в крови животных антител к дорназе альфа может быть свидетельством экзогенного аллергического альвеолита. Однако по данным литературы, гистологическая картина, характерная для острой, подострой и хронической фазы экзогенного аллергического альвеолита, иная: в острой фазе выявляются воспалительный инфильтрат в стенках

альвеол, гранулемы в альвеолярных перегородках и стенках бронхиол, в подострую фазу появляются эпителиоидно-клеточные гранулемы, трансформирующиеся со временем в соединительнотканые структуры с последующим развитием фиброза [1, 5].

Выявленные изменения являются скорее реакцией на эвтаназию углекислым газом, а отсутствие клеточной инфильтрации подтверждает отсутствие воспалительной реакции в ткани. По этой же причине, вероятно, развился и ацидоз, выявленный в цитоплазме некоторых канальцев почек юных животных. Таким образом, 28-дневное введение Д-Т в дозе, 6-кратно превышающей терапевтическую рекомендованную для применения (0,20 и 0,26 мг/кг/день), не вызывает у половозрелых и юных животных функциональных и морфологических патологических изменений. По изученным показателям сравниваемые препараты Д-Т и Д-П не различались.

Содержание дорназы альфа после ингаляции Д-Т или Д-П в образцах тканей лёгких и бронхов животных достоверно не различалось при анализе в непарном параметрическом Т-тесте, а соотношение зна-

чений параметров  $Stax$ ,  $AUC_{last}$  и  $T_{1/2}$  (ч) укладывалось в диапазон биоэквивалентности 0,8–1,25, что свидетельствует о биоаналогичности Д-Т.

У половозрелых животных, но не у юных, введение препаратов дорназы альфа вызвало появление АЛА (антител к дорназе альфа), пик пришёлся на 42-й день, при этом титр антител был довольно высоким (1:80 и выше у 42,9% крыс группы Д-Т и у 37,5% в группе Д-П). По количеству животных, у которых выявлены антитела, препараты значимо не различались. По данным клинических исследований, у препаратов, содержащих дорназу альфа, имеется слабо выраженная иммуногенность: у небольшой части больных (8,7%

и 2–4% при 12- или 24-недельном применении, соответственно) отмечено появление в сыворотке крови антител IgG к дорназе альфа, при этом анафилактических реакций не зафиксировано [11, 18].

## Выводы

Лекарственный препарат Тигераза® производства АО «ГЕНЕРИУМ» по специфической ферментативной активности *in vitro*, муколитической (секретолитической) ДНКазной активности *ex vivo*, профилю безопасности, основным фармакокинетическим параметрам сопоставим с референтным лекарственным препаратом Пульмозим® производства «Хоффманн-Ля Рош Лтд.».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Авдеева О.Е., Авдеев С.Н., Чучалин А.Г. Экзогенный аллергический альвеолит. *Русский медицинский журнал*. 1997;17:6. [Avdeeva O.E., Avdeev S.N., Tchuchalin A.G. Ekzogenный allergitceskii alveolit [Exogenous allergic alveolitis]. *Russian medical journal*. 1997;17:6. (In Russian)].
2. Ельцова Е.А., Раменская Г.В., Смолярчук Е.А., Бушманова А.В. Биосимиляры – препараты будущего. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2015;1:12-15. [Eltsova E.A., Ramenskaia G.V., Smoliartshuk E.A., Bushmanova A.V. Biosimilari – preparati budushchego [Biosimilars are the drugs of the future]. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2015;1:12-15. (In Russian)].
3. Кистозный фиброз (муковисцидоз). *Клин. реком. Союз педиатров России, Ассоциация медицинских генетиков, Российское респираторное общество, Российское трансплантологическое общество, Ассоциация детских врачей Московской области*, 2021. [Cystic fibrosis. *Clinical recommendation*. Union of Pediatricians of Russia, Association of Pregnant Geneticists, Russian Respiratory Society, Russian Transplant Society, Association of Children's Doctors of the Moscow Region, 2021. (In Russian)]. URL: <https://mukoviscidoz.org/doc/%D0%9A%D0%A0372.pdf>
4. Колбин А.С., Гомон Ю.М., Карпов О.И., Балыкина Ю.Е., Проскурин М.А. Муковисцидоз как социально-экономическая проблема. *Качественная клиническая практика*. 2020;5:38-49. DOI: 10.37489/2588-0519-2020-5-38-49. [Kolbin A.S., Gomon Ju.M., Karpov O.I., Balikina Ju.E., Proskurin M.A. Mukovistsidoz kak sotsialno-ekonomicheskaia problema [Cystic fibrosis as economic social problem]. *Kachestvennaia klinicheskaia praktika [Good clinical practice]*. 2020;5:38-49. (In Russian)]. DOI: 10.37489/2588-0519-2020-5-38-49.
5. Косарев В.В., Бабанов С.А. Экзогенный аллергический альвеолит: проблемы диагностики. *Российский медицинский журнал*. 2013;7:388-392. [Kosarev V.V., Babanov S.A. Ekzogenный allergitceskii alveolit: problemi diagnostiki [Exogenous allergic alveolitis: problems in diagnosis]. *Russian medical journal*. 2013;7:388-392. (In Russian)].
6. *Международная классификация болезней 10-го пересмотра (МКБ-10)*. [Mezhdunarodnaia klassifikatsia boleznei 10-go peresmotra (МКБ-10) [International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems ICD-10 Updates (ICD-10)]. (In Russian)].
7. *Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2019 год*. [Registr bolnih mukovistsedozom v Rossijskoi Federatsii [Register of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation]. 2019. (In Russian)]. URL: [https://mukoviscidoz.org/doc/registr/site\\_Registre\\_2019.pdf](https://mukoviscidoz.org/doc/registr/site_Registre_2019.pdf)
8. Cooney A.L., McCray P.B. Jr., Sinn P.L. Cystic fibrosis gene therapy: Looking back, looking forward. *Genes (Basel)*. 2018;9(11):538–561. DOI: 10.3390/genes9110538.
9. Dayan A.D. Pharmacological-toxicological (Expert report on recombinant human Deoxyribonuclease I (rhDNase; PulmozymeTM). *Hum. Exper. Toxicology*. 1994;13:S2–S42. DOI: 10.1177/096032719401300101.

10. Dechecchi M.C., Tamanini A., Cabrini G. Molecular basis of cystic fibrosis: From bench to bedside. *Ann. Transl. Med.* 2018;6(17):334. DOI: 10.21037/atm.2018.06.48.
11. Eisenberg J.D., Aitken M.L., Dorkin H.L., Harwood I.R., Ramsey B.W., Schidlow D.V., Wilmott R.W., Wohl M.E., Fuchs H.J., Christiansen D.H., Smith A.L. Safety of repeated intermittent courses of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease in patients with cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 1997;131(1 Pt 1):118–124. DOI: 10.1016/s0022-3476(97)70134-3.
12. El-Bakry L. The future of biosimilars. *Int. J. Drug Delivery.* 2017;9:01–02. DOI: 10.5138/09750215.1930.
13. *Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2.* European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf).
14. Farfan-Portet M-I., Gerkens S., Lepage-Nefkens I., Vinck L., Hulstaert F. Are biosimilars the next tool to guarantee cost-containment for pharmaceutical expenditures? *Eur. J. Health Econ.* 2014;15(3):223–228. DOI: 10.1007/s10198-013-0538-4.
15. *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1).* EMA/CHMP/BWP/247713/2012. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2014. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active\\_en-0.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-0.pdf).
16. *Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues.* CHMP/BMWP/403543/2010, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2012. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-monoclonal-antibodies-non-clinical\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-monoclonal-antibodies-non-clinical_en.pdf).
17. *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as drug substance: non-clinical and clinical issues.* EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev 1, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2014. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active\\_en-2.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-2.pdf).
18. Hodson M.E. Aerosolized dornase alfa (rhDNase) for therapy of cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;151(3 Pt 2):S70–S74. DOI: 10.1164/ajrcm/151.3\_Pt\_2.S70.
19. Honavar S.G. From biologics to biosimilars and biobetters — democratization of high-end therapeutics. *Indian J. Ophthalmol.* 2021;69(2):207–208. DOI: 10.4103/ijo.IJO\_150\_21.
20. Semaniakou A., Croll R.P., Chappe V. Animal models in the pathophysiology of cystic fibrosis. *Front Pharmacol.* 2018;9:1475. DOI: 10.3389/fphar.2018.01475.
21. Shankar G., Devanarayan V., Amaravadi L., Barrett Y.C., Bowsher R., Finco-Kent D., Fiscella M., Gorovits B., Kirschner S., Moxness M., Parish T., Quarby V., Smith H., Smith W., Zuckerman L.A., Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008;48(5):1267–1281. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.09.020.
22. Welsh M.J., Smith A.E. Molecular mechanism of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993;73(7):1251–1254. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90353-r.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Аксёнова Мария Сергеевна**, АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: Aksenova@ibcgenerium.ru](mailto:Aksenova@ibcgenerium.ru)

**Бочарова Евгения Николаевна**, к.б.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: Varenik@ibcgenerium.ru](mailto:Varenik@ibcgenerium.ru)

**Аббасова Светлана Георгиевна**, д.б.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: Abbasova@ibcgenerium.ru](mailto:Abbasova@ibcgenerium.ru)

**Пonomарёв Александр Сергеевич**, ФГБУ  
«48 Центральный научно-исследовательский  
институт» Минобороны России

**Логинова Валентина Викторовна**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: loginova@ibcgenerium.ru](mailto:loginova@ibcgenerium.ru)

**Maria S. Aksenova**, АО “GENERIUM”;  
[e-mail: Aksenova@ibcgenerium.ru](mailto:Aksenova@ibcgenerium.ru)

**Eugenia N. Bocharova**, Cand. Sci. (Biol.),  
АО “GENERIUM”;  
[e-mail: Varenik@ibcgenerium.ru](mailto:Varenik@ibcgenerium.ru)

**Svetlana G. Abbasova**, Dr. Sci. (Biol.),  
АО “GENERIUM”;  
[e-mail: Abbasova@ibcgenerium.ru](mailto:Abbasova@ibcgenerium.ru)

**Aleksander S. Ponomarev**, 48 Central Research  
Institute of the Ministry of Defense of Russia

**Valentina V. Loginova**, АО “GENERIUM”;  
[e-mail: loginova@ibcgenerium.ru](mailto:loginova@ibcgenerium.ru)

**Болотникова Мария Валентиновна**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: bolotnikova@ibcgenerium.ru](mailto:bolotnikova@ibcgenerium.ru)

**Бельская Наталья Витальевна\***, д.м.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: nvbelskaya@generium.ru](mailto:nvbelskaya@generium.ru)

**Казаров Александр Александрович**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: kazarov@ibcgenerium.ru](mailto:kazarov@ibcgenerium.ru)

**Лисова Алёна Евгеньевна**, АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: aelisova@ibcgenerium.ru](mailto:aelisova@ibcgenerium.ru)

**Кудина Наталья Константиновна**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: kudina@ibcgenerium.ru](mailto:kudina@ibcgenerium.ru)

**Пантюшенко Марина Семеновна**, к.б.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: pantushenko@ibcgenerium.ru](mailto:pantushenko@ibcgenerium.ru)

**Жилиева Мария Владимировна**,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: zhiliaeva@ibcgenerium.ru](mailto:zhiliaeva@ibcgenerium.ru)

**Копеин Дамир Сергеевич**, АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: kopein@ibcgenerium.ru](mailto:kopein@ibcgenerium.ru)

**Карелов Юрий Михайлович**, ФГБУ  
«48 Центральный научно-исследовательский  
институт» Минобороны России

**Эрастов Георгий Геннадьевич**, ФГБУ  
«48 Центральный научно-исследовательский  
институт» Минобороны России

**Лыков Максим Валерьевич**, к.м.н.,  
АО «ГЕНЕРИУМ»;  
[e-mail: lykov@ibcgenerium.ru](mailto:lykov@ibcgenerium.ru)

**Хамитов Равиль Авгатович**, д.м.н., проф.,  
Заслуженный деятель науки РФ,  
АО «ГЕНЕРИУМ»

**Maria V. Bolotnikova**, АО “GENERIUM”;  
[e-mail: bolotnikova@ibcgenerium.ru](mailto:bolotnikova@ibcgenerium.ru)

**Nataliya V. Belskaya\***, Dr. Sci. (Med.),  
АО “GENERIUM”;  
[e-mail: nvbelskaya@generium.ru](mailto:nvbelskaya@generium.ru)

**Aleksander A. Kazarov**, АО “GENERIUM”;  
[e-mail: kazarov@ibcgenerium.ru](mailto:kazarov@ibcgenerium.ru)

**Alena E. Lisova**, АО “GENERIUM”;  
[e-mail: aelisova@ibcgenerium.ru](mailto:aelisova@ibcgenerium.ru)

**Nataliya K. Kudina**, АО “GENERIUM”;  
[e-mail: kudina@ibcgenerium.ru](mailto:kudina@ibcgenerium.ru)

**Marina S. Pantyushenko**, Cand. Sci. (Biol.),  
АО “GENERIUM”;  
[e-mail: pantushenko@ibcgenerium.ru](mailto:pantushenko@ibcgenerium.ru)

**Maria V. Zhilyaeva**, АО “GENERIUM”;  
[e-mail: zhiliaeva@ibcgenerium.ru](mailto:zhiliaeva@ibcgenerium.ru)

**Damir S. Kopein**, АО “GENERIUM”;  
[e-mail: kopein@ibcgenerium.ru](mailto:kopein@ibcgenerium.ru)

**Yuri M. Karelov**, 48 Central Research Institute  
of the Ministry of Defense of Russia

**Georgiy G. Erastov**, 48 Central Research Institute  
of the Ministry of Defense of Russia

**Maksim V. Lykov**, Cand. Sci. (Med.),  
АО “GENERIUM”;  
[e-mail: lykov@ibcgenerium.ru](mailto:lykov@ibcgenerium.ru)

**Ravil A. Chamitov**, Dr. Sci. (Med.), Prof.,  
Honored Scientist of the Russian Federation,  
АО “GENERIUM”

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИНОЦИЦЕПТИВНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОЙ МОЛЕКУЛЫ ИЗ КЛАССА ГЕКСААЗАИЗОВЮРЦИТАНОВ

Е.А. Киселева<sup>1</sup>, С.Г. Крылова<sup>1,\*</sup>, Т.Н. Поветьева<sup>1</sup>, Ю.В. Нестерова<sup>1</sup>, О.Г. Афанасьева<sup>1</sup>, П.В. Кульпин<sup>1</sup>, Д.А. Кулагина<sup>2</sup>, Е.П. Зуева<sup>1</sup>, Н.И. Суслов<sup>1</sup>, В.В. Еремина<sup>2</sup>, О.В. Байбакова<sup>2</sup>, С.В. Сысолятин<sup>2</sup>, В.В. Жданов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» 634028, Российская Федерация, Томск, пр. Ленина, 3

<sup>2</sup> ФГБНУ Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН 659322, Российская Федерация, Алтайский край, Бийск, ул. Социалистическая, 1

Изучение фармакологической активности на моделях соматогенной боли различного генеза (при термической, висцеральной боли, механической компрессии) выявило высокую обезболивающую активность впервые синтезированного вещества 4-(3,4-дибромтиофенилкарбонил)-10-(2-этоксацетил)-2,6,8,12-тетраацетил-2,4,6,8,10,12гексаазатетрацикло[5,5,0,0,3,11,05,9]додекана (МЗ), сравнимую и/или превышающую эффект трамадола. Показано, что новая молекула из класса гексаазаизовюрцитанов эффективно блокирует ноцицептивные реакции на супраспинальном, спинальном и периферическом уровнях организации болевой чувствительности. Полученные результаты подтверждают возможность разработки фармакологически активных молекул на основе высокоэнергетического вещества гексаазаизовюрцитана, что является отечественным приоритетным направлением в мировой фармации.

**Ключевые слова:** гексаазаизовюрцитан, анальгетик, модели соматогенной боли, трамадол

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Киселева Е.А., Крылова С.Г., Поветьева Т.Н., Нестерова Ю.В., Афанасьева О.Г., Кульпин П.В., Кулагина Д.А., Зуева Е.П., Суслов Н.И., Еремина В.В., Байбакова О.В., Сысолятин С.В., Жданов В.В. Исследование антиноцицептивной активности новой молекулы из класса гексаазаизовюрцитанов. *Биомедицина*. 2023;19(1):61–72. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-61-72>

Поступила 07.07.2022

Принята после доработки 17.10.2022

Опубликована 10.03.2023

## STUDY INTO ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF A NEW MOLECULE FROM THE CLASS OF HEXAAZAIZOWURZITANE

Elena A. Kiseleva<sup>1</sup>, Svetlana G. Krylova<sup>1,\*</sup>, Tatyana N. Povet`eva<sup>1</sup>, Yuliya V. Nesterova<sup>1</sup>, Olga G. Afanas`eva<sup>1</sup>, Pavel V. Kul`pin<sup>1</sup>, Daria A. Kulagina<sup>2</sup>, Elena P. Zueva<sup>1</sup>, Nikolay I. Suslov<sup>1</sup>, Valeria V. Eremina<sup>2</sup>, Olga V. Baibakova<sup>2</sup>, Sergey V. Sysolyatin<sup>2</sup>, Vadim V. Zhdanov<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences 659322, Russian Federation, Altai Territory, Biysk, Sotsialisticheskaya Str., 1

In this work, we studied the pharmacological activity of a newly-synthesized compound 4-(3,4-dibromothiophenylcarbonyl)-10-(2-ethoxyacetyl)-2,6,8,12-tetraacetyl-2,4,6,8,10,12-hexaazatetracyclo[5,5,0,0,3,11,05,9]dodecane (M3) using somatogenic pain models of various genesis (thermal and visceral pain, mechanical compression of a paw). The compound showed a high antinociceptive efficacy, comparable to or exceeding that of tramadol. It was shown that the new molecule from the class of hexaazaisowurtzitane effectively blocks nociceptive reactions at the supraspinal and peripheral levels of pain sensitivity organization. The results obtained confirm the possibility of creating new pharmacologically active molecules based on the high-energy substance of hexaazaisowurtzitane, which is a priority in domestic pharmaceutical production.

**Keywords:** hexaazaisowurtzitane, analgetic, models of somatogenic pain, tramadol

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

**For citation:** Kiseleva E.A., Krylova S.G., Povet'eva T.N., Nesterova Y.V., Afanas'eva O.G., Kul'pin P.V., Kulagina D.A., Zueva E.P., Suslov N.I., Eremina V.V., Baibakova O.V., Sysolyatin S.V., Zhdanov V.V. Study Into Antinociceptive Activity of a New Molecule from the Class of Hexaazaisowurtzitane. *Journal Biomed.* 2023;19(1):61–72. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-61-72>

Submitted 07.07.2022

Revised 17.10.2022

Published 10.03.2023

## Введение

Современный арсенал анальгетиков в большинстве стран мира базируется на классических синтетических и полусинтетических соединениях, реализующих свой противоболевой потенциал путём взаимодействия с разнообразными рецепторами периферической и центральной нервной системы. В настоящее время сформированы представления о терапевтическом потенциале каждой из групп анальгетиков, фармакологи продолжают разрабатывать различные лекарственные формы, совершенствовать пути доставки субстанции, врачи — оптимизировать современные стандарты терапии острых и хронических болевых синдромов [9, 11, 14]. Результатом этой фармацевтической эволюции стало появление большого количества болеутоляющих средств, смягчены клинические проявления нежелательных и побочных эффектов [6, 9]. Однако задача купирования острых и лечения хронических болевых синдромов не теряет своей актуальности и отражает растущую потребность в эффективных и безопасных средствах анальгетической терапии. Масштаб проблем, связанных с нежелательными побочными эффектами

НПВС и злоупотреблением опиоидными анальгетиками как лекарственными препаратами для медицинского применения, привёл к т. н. «опиоидному кризису» [2, 5, 6, 9]. Исходя из вышесказанного, необходимость дальнейшего изыскания и изучения принципиально новых молекулярных структур по фармакодинамическим и фармакокинетическим характеристикам для разработки безопасных и эффективных анальгетиков сохраняет социальную и медицинскую значимость.

Перспективным направлением в области современной органической и медицинской химии является создание селективных методов синтеза фармакологически активных соединений на основе азотсодержащих гетероциклических структур [12]. В работах последних лет российскими учёными доказана возможность применения высокоэнергетического вещества 2, 4, 6, 8, 10, 12гексаазатетрацикло[5, 5, 0, 0<sup>3,11</sup>, 0<sup>5,9</sup>]додекана(гексаазазиворцитана) в качестве фармакофора для синтеза инновационных молекул-кандидатов для разработки эффективных анальгетиков [7, 12]. Так, на основе first-in-class молекулы из класса гексаазазиворцитанов — 4-(3,4-дибромтиофенкарбонил)-2,6,8,

12-тетраацетил-2, 4, 6, 8, 10, 12 гексаазатетрацикло[5, 5, 0, 0<sup>3,11</sup>, 0<sup>5,9</sup>]додекана — создан экспериментальный образец высокоэффективного малотоксичного анальгетика «Тиовюрцин, капсулы 120 мг» с мультитаргетным механизмом действия [2, 7, 10]. Заявленное научное направление получило дальнейшее развитие, в результате чего в соответствии с разработанной методологией в ИПХЭТ СО РАН синтезирована новая гибридная молекула — 4-(3,4-дибромтиофенилкарбонил)-10-(2-этоксиацетил)-2, 6, 8, 12-тетраацетил-2, 4, 6, 8, 10, 12гексаазатетрацикло[5, 5, 0, 0<sup>3,11</sup>, 0<sup>5,9</sup>]додекан (МЗ) из класса гексаазазиворцианов. Показано, что МЗ обладает низким профилем токсичности: при максимально возможном объёме однократного введения вещества: LD<sub>50</sub> (или гибели животных) достигнуто не было. Пилотные исследования МЗ позволили выбрать дозы 25, 50, 100 и 200 мг/кг при внутрижелудочном пути введения, обусловленном физико-химическими свойствами вещества, для изучения анальгетической активности.

**Целью** данной работы явилось исследование анальгетического действия 4-(3,4-дибромтиофенилкарбонил)-10-(2-этоксиацетил)-2, 6, 8, 12-тетраацетил-2, 4, 6, 8, 10, 12 гексаазатетрацикло[5, 5, 0, 0<sup>3,11</sup>, 0<sup>5,9</sup>]додекана в сравнении с трамадолом в тестах соматогенной боли («кусусные корчи», «термическая иммерсия хвоста», «механическая компрессия лапы»).

## Материалы и методы

Эксперименты были выполнены на аутбредных мышах-самцах (n=194) CD1 (массой 22–27 г) первой категории конвенциональных, полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ. Содержание животных и дизайн экспериментов были одобрены комиссией по биоэтике НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга и соответствовали директиве 2010/63/EU Европейского

парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях; ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» от 01.08.2015.

Животные содержались в условиях конвенционального вивария в неполной барьерной системе при нормативных параметрах окружающей среды. Мышей размещали в полисульфоновых или поликарбонатных клетках (VELAZ, Чехия или Tecniplast, Италия) в соответствии с нормами размещения (не более 8–10 особей). Животные имели постоянный доступ к корму и воде. Все эксперименты были проведены в осенне-зимний период. Выведение животных из эксперимента осуществляли в CO<sub>2</sub>-камере.

Объектом исследования являлось вещество 4-(3,4-дибромтиофенилкарбонил)-10-(2-этоксиацетил)-2, 6, 8, 12-тетраацетил-2, 4, 6, 8, 10, 12-гексаазатетрацикло[5, 5, 0, 0<sup>3,11</sup>, 0<sup>5,9</sup>]додекан, впервые полученное методом направленного синтеза по результатам анализа профиля потенциальной биологической активности согласно расчётам программы PASS в ИПХЭТ СО РАН (Бийск, Россия).

Соединение представляет собой кристаллический продукт с содержанием основного вещества 99,14% (метод ВЭЖХ), с растворимостью: в этаноле — 0,14 г/л, в воде — 0,016 г/л. Характеристика МЗ полностью подтверждена физико-химическими методами исследования, включающими в себя ИК- и ЯМР-спектроскопию, элементный анализ.

Вещество вводили в желудок через аграмматичный зонд ежедневно в диапазоне доз 25–200 мг/кг в течение 1–3 сут, в случае курсового применения тиовюрцина последнее введение осуществляли за 1 ч до тестирования болевой чувствительности. В качестве растворителя использовали воду очищенную с добавлением 20 мкл ТВИН-80 (Полисорбат LAUROPAN T/80, Италия) на 1 мл воды. В качестве препарата

сравнения применяли трамадол (ОАО «Органика») в дозе 10 мг/кг *per os*. Мыши групп контроля получали эквивалентные количества растворителя при аналогичном пути и режиме введения.

На модели «уксусные корчи» (abdominal constriction test), направленной на исследование острой висцеральной и соматически глубокой боли, анальгетический эффект оценивали по способности вещества (в течение 15 мин после внутривенной инъекции 0,75% р-ра уксусной кислоты в количестве 0,1 мл/10 г массы тела мыши) уменьшать (в процентах) количество «корчей» по сравнению с контролем [1, 8]. Болевое раздражение в тесте «тепловой иммерсии хвоста» (tail immersion) моделировали погружением хвоста мыши в горячую воду температурой 54 °С в установку с термостатом [1, 8]. Регистрировали латентный период реакции отдергивания хвоста (время избавления от болевого раздражителя). Удлинение времени реакции интерпретировали как обезболивающее действие, при этом максимальное время экспозиции хвоста в горячей воде составляло 30 сек. Критерием анальгетической активности считали эффективность по показателю максимально возможного эффекта (МВЭ, %):  $\text{ЛП}_0 - \text{ЛП}_k / (30 - \text{ЛП}_k) \times 100$ , где  $\text{ЛП}_0$  — латентный период ноцицептивной реакции в опытной группе;  $\text{ЛП}_k$  — латентный период ноцицептивной реакции в контрольной группе; 30 — максимальное время экспозиции для мышей (в секундах). В тесте «механической компрессии» лапы использовали анальгезиметр («Ugo Basile», Италия) для оценки порога болевой чувствительности по методу Рэндалла – Селитто (Randall – Selitto test) [1, 8]. Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое уменьшение интенсивности болевых реакций, оценённой (в г) по силе воздействия на лапу, латентному времени болевой реакции, числу животных без болевой реакции в течение 15 сек фиксации мыши в анальгезиметре.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Для всех данных рассчитаны: среднее значение ( $\bar{X}$ ) и стандартное отклонение ( $m$ ), которые вместе со значением  $n$  (количество вариант) представлены в итоговых таблицах. Межгрупповые различия проверялись с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса и Вилкоксона–Манна–Уитни, для сравнения частот использовали критерий углового преобразования Фишера. При повторном измерении применяли дисперсионный двухфакторный анализ (two-way ANOVA). Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$  [3, 4].

### Результаты исследований

Как видно из таблицы 1, у животных группы контроля отмечали в течение 15 мин наблюдения выраженную болевую реакцию, которая заключалась в развитии уксусных «корчей» ( $22,6 \pm 2,1$ ) при латентном времени их наступления ( $222 \pm 18$ ) с.

Трамадол в терапевтической дозе 10 мг/кг при курсовом введении (3 сут) купировал болевой ответ (УБР=22,1%) за счёт снижения количества «корчей» в 1,3 раза и статистически значимого повышения латентного времени развития болевой реакции в 1,2 раза относительно такового показателя контроля (табл. 1).

Исследуемое вещество в дозе 25 мг/кг оказывало анальгетическую активность (33,6%), обусловленную статистически значимым снижением количества «корчей» в 1,5 раза и увеличением латентного времени наступления болевого ответа в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). После введения МЗ в дозе 50 мг/кг отмечалось его обезболивающее действие (35,8%), которое выражалось в снижении количества «корчей» в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) и увеличении латентного времени развития болевой реакции в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с соответствующи-

**Таблица 1.** Анальгетическая активность вещества М3 после курсового (3 сут) введения в диапазоне доз 25, 50, 100 и 200 мг/кг per os в сравнении с трамадолом (10 мг/кг per os) на модели химического болевого раздражения брюшины у аутбредных мышей-самцов CD1

**Table 1.** Analgesic activity of the substance M3 after a course (3 days) application in the dose range of 25, 50, 100 and 200 mg/kg per os (3 days) in comparison with tramadol on an abdominal constriction test in outbred CD1 male mice

Группа наблюдения, доза (количество животных)	Количество «корчей» за 15 мин ( $X \pm t$ )	Латентное время развития болевой реакции ( $X \pm t$ ), сек	Угнетение болевой реакции, %
1. Контроль (n=16)	22,6±2,1	222±18	0
2. Трамадол, 10 мг/кг (n=10)	17,6±1,8	278±17 <sup>*1-2</sup>	22,1
3. М3, 25 мг/кг (n=10)	15,0±3,0 <sup>*1-3</sup>	302±39 <sup>*1-3</sup>	33,6
4. М3, 50 мг/кг (n=10)	14,5±3,2 <sup>*1-4</sup>	345±67 <sup>*1-4</sup>	35,8
5. М3, 100 мг/кг (n=10)	9,6±1,2 <sup>**1-5, **2-5</sup>	293±25 <sup>*1-5</sup>	57,5 <sup>#2-5</sup>
6. М3, 200 мг/кг (n=10)	10,6±2,5 <sup>**1-6, **2-6</sup>	309±25 <sup>*1-6</sup>	53,1

**Примечание:** после \* ( $p < 0,05$ ) и \*\* ( $p < 0,01$ ) указаны номера сравниваемых групп (критерий Манна–Уитни, критерий Краскела–Уоллисса); # —  $p < 0,05$  (критерий Фишера).

**Note:** the numbers after \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ) indicate the compared groups (according to Kruskal–Wallis and Wilcoxon–Mann–Whitney), # —  $p < 0.05$  (according to Fischer).

ми значениями контроля. Увеличение дозы вещества до 100 мг/кг приводило к повышению его антиноцицептивного действия до 57,5%, поскольку все изучаемые показатели оказались статистически значимы по сравнению с соответствующими значениями контроля. Кроме того, выявлена преобладающая активность М3 по сравнению с трамадолом, которая выражалась в снижении количества «корчей» в 1,8 раза ( $p < 0,01$ ) относительно показателя референс-препарата. Повышение дозы вещества до 200 мг/кг не приводило к увеличению эффективности, поскольку анальгетическая активность составила 53,1% ( $p < 0,01$ ) за счёт статистически значимого снижения количества «корчей» в 2,1 раза относительно соответствующего значения контроля. Вместе с тем, М3 в этой дозе превышало активность трамадола по количеству «корчей», которое оказалось меньше в 1,7 раза ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, вещество М3 в тесте «уксусные корчи» проявило выраженную анальгетическую активность в диапазоне доз 25–200 мг/кг, превышающую эффект референс-препарата в дозах 100 и 200 мг/кг. Снижение болевой реакции более чем на 50% в тесте «уксусные корчи», коррелирующем с клинической ситуацией остро

перитонита, свидетельствует о целесообразности исследования в ноцицептивных тестах с другими болевыми раздражителями.

Обезболивающее действие трамадола в тесте «термической иммерсии хвоста» при погружении в горячую воду заключалось в статистически значимом увеличении латентного времени болевой реакции в 2,1 раза относительно соответствующего значения контроля, в результате чего его эффект составил 49,8% (табл. 2).

Исследуемое вещество М3 продемонстрировало выраженное обезболивающее действие при введении во всех дозах (табл. 2). После применения дозы 25 мг/кг выявлен максимальный эффект соединения (75,6%), превышающий аналогичное значение контроля в 2,7 раза ( $p < 0,01$ ) и трамадола в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ). В результате введения М3 в дозах 50, 100 и 200 мг/кг показатели латентного времени болевого ответа имели статистически значимую разницу только со значением контроля, а показатели максимально выраженного эффекта оказались сравнимы с трамадолом (49,8%) и составили 60,8%, 70,3% и 69,9% соответственно. Кроме того, выявлены животные с максимальным проявлением обезболивающего эффекта — экспозицией хвоста в течение 30 сек в горячей воде: после введения доз

**Таблица 2.** Анальгетический эффект МЗ после однократного применения в диапазоне доз 25, 50, 100 и 200 мг/кг per os в сравнении с трамадолом (10 мг/кг per os) в тесте «тепловая иммерсия хвоста» у аутбредных мышей-самцов CD1

**Table 2.** Analgesic effect of M3 after a single application in the dose range of 25, 50, 100 and 200 mg/kg per os compared with tramadol (10 mg/kg per os) in a thermal tail immersion test in outbred mice CD1

Группа, доза (количество животных)	Латентное время развития болевой реакции, сек (X±m)	Максимально выраженный эффект, %	Количество мышей с 30 сек экспозицией, %
1. Контроль (n=12)	9,1±1,2	222±18	0
2. Трамадол, 10 мг/кг (n=10)	19,5±2,1** <sup>1-2</sup>	278±17** <sup>1-2</sup>	22,1
3. МЗ, 25 мг/кг (n=10)	24,9±2,0** <sup>1-2, *2-6</sup>	302±39** <sup>1-3</sup>	33,6
4. МЗ, 50 мг/кг (n=10)	21,8±2,6** <sup>1-3</sup>	345±67** <sup>1-4</sup>	35,8
5. МЗ, 100 мг/кг (n=10)	23,8±2,1** <sup>1-4</sup>	293±25** <sup>1-5</sup>	57,5** <sup>2-5</sup>
6. МЗ, 200 мг/кг (n=10)	23,7±2,0** <sup>1-5</sup>	309±25** <sup>1-6</sup>	53,1

**Примечание:** после \* ( $p<0,05$ ) и \*\* ( $p<0,01$ ) указаны номера сравниваемых групп (критерий Манна – Уитни, критерий Краскела – Уоллисса); ## —  $p<0,01$  (критерий Фишера).

**Note:** the numbers after \* ( $p<0.05$ ) and \*\* ( $p<0.01$ ) indicate the compared groups (according to Kruskal — Wallis and Wilcoxon — Mann — Whitney), # —  $p<0.05$  (according to Fischer).

25 мг/кг — 30% ( $p<0,01$ ), 50 мг/кг — 30% ( $p<0,01$ ), 100 мг/кг — 40% ( $p<0,01$ ) против 0% контроля. Следует отметить, что при использовании МЗ в дозе 100 мг/кг данный показатель статистически значимо превышал таковое значение трамадола (40% против 10%).

Полученные данные свидетельствуют о выраженном обезболивающем действии соединения МЗ при однократном внутрижелудочном введении в условиях теста термического болевого раздражения «тепловая иммерсия хвоста». Максимально выраженный эффект во всех дозах превышал пороговый уровень 50%, оказался сравнимым/или превосходил (25 мг/кг, 100 мг/кг) по ряду показателей активность трамадола.

Тест Рендалла–Селитто основан на спинальном рефлексе отдергивания конечности, комплекса супраспинальных двигательных реакций животного, направленного на освобождение конечности и вокализацию [1, 8]. Величина болевого порога, фиксируемая по силе давления на лапу, при которой животное пытается освободить конечность, через 1 ч после введения растворителя в контроле составляла в первые сутки наблюдения 160,2±27,8 г, на третьи сутки — 284,0±65,7 г (табл. 3). Отмечалось повышение латентного времени наступления

болевого реакции от 3,0±0,6 сек (1 сут) до 5,6±1,4 сек (3 сут) и числа животных с максимальной экспозицией от 0 до 9,1%. Изменение исследуемых показателей контроля характерно для этой экспериментальной модели при повторном тестировании животных.

Порог болевой чувствительности референс-препарата трамадола оказался сопоставим как при однократном, так и при трёхкратном введении и статистически значимым относительно соответствующих показателей контроля (табл. 3). Следует отметить увеличение в 1 сут наблюдения показателя времени болевого ответа в 4,1 раза ( $p<0,01$ ), числа мышей без болевой реакции — до 70% ( $p<0,01$ ) относительно аналогичных значений контроля. Сходная картина фиксировалась через 3 сут введения в группе трамадола: латентное время болевого ответа увеличилось в 1,9 раза ( $p<0,05$ ) относительно соответствующего значения контроля, а число мышей с максимальной экспозицией составило 50% ( $p<0,01$ ) против 0% в контроле (табл. 3).

Статистически значимое повышение порога болевого ответа в первый срок наблюдения отмечалось во всех группах применения соединения МЗ: 25 мг/кг — в 2,9 раза ( $p<0,05$ ),

**Таблица 3.** Анальгетический эффект вещества М3 при однократном и курсовом (3 сут) внутривенном введении в диапазоне доз 25–200 мг/кг в сравнении с трамадолом (10 мг/кг per os) в тесте «механической компрессии» лапы (тест Рендалла – Селитто) у аутбредных мышей-самцов CD1  
**Table 3.** Analgesic activity of M3 after a single and a course (3 days) application in the dose range of 25, 50, 100 and 200 mg/kg per os in comparison with tramadol in a mechanical compression paw test (Rendal Seltitto) in outbred CD1 male mice

Группа наблюдения, доза (количество животных)	1-е сутки				3-и сутки			
	Сила воздействия на лапу (болевого порог) (X±m), г	Латентное время наступления реакции (X±m), сек	Шкала (X±m), ед.	Число мышей без проявления болевой реакции в течение 15 сек, %	Сила воздействия на лапу (болевого порог) (X±m), г	Латентное время наступления реакции (X±m), сек	Шкала (X±m), ед.	Число мышей без проявления болевой реакции в течение 15 сек, %
1. Контроль, вода (n=9)	160,2±27,8	3,0±0,6	5,3±0,9	0	284,0±65,7	5,6±1,4	9,5±2,3	9,1
2. Трамадол, 10 мг/кг (n=8)	566,0±68,7 <sup>^</sup>	12,2±1,6 <sup>^</sup>	20,3±2,6 <sup>^</sup>	70 <sup>##1-2</sup>	526,0±76,1 <sup>^</sup>	10,9±1,6 <sup>^</sup>	18,1±2,7 <sup>^</sup>	50 <sup>##1-2</sup>
3. М3, 25 мг/кг (n=9)	470,0±91,8 <sup>^</sup>	10,0±2,1 <sup>^</sup>	16,8±3,4 <sup>^</sup>	60 <sup>##1-3</sup>	556,0±71,8 <sup>^</sup>	12,0±1,6 <sup>^</sup>	19,9±2,7 <sup>^</sup>	70 <sup>##1-3</sup>
4. М3, 50 мг/кг (n=8)	544,4±61,9 <sup>^</sup>	11,4±1,4 <sup>^</sup>	19,0±2,3 <sup>^</sup>	50 <sup>##1-4</sup>	605,0±56,9 <sup>^</sup>	13,2±1,3 <sup>^</sup>	22,0±2,1 <sup>^</sup>	80 <sup>##1-4</sup>
5. М3, 100 мг/кг (n=9)	497,5±77,3 <sup>^</sup>	10,8±1,8 <sup>^</sup>	18,0±3,0 <sup>^</sup>	60 <sup>##1-5</sup>	677,0±7,5 <sup>^</sup>	14,9±0,1 <sup>^</sup>	24,7±0,3 <sup>^</sup>	90 <sup>##1-5, ##2-5</sup>
6. М3, 200 мг/кг (n=9)	625,4±62,5 <sup>^</sup>	13,6±1,4 <sup>^</sup>	22,7±2,3 <sup>^</sup>	90 <sup>##1-6, ##4-6</sup>	635,0±36,7 <sup>^</sup>	13,8±0,8 <sup>^</sup>	22,9±1,4 <sup>^</sup>	80 <sup>##1-6</sup>

**Примечание:** # —  $p < 0,05$ , ## —  $p < 0,01$  (критерий Фишера), статистически значимые отличия ( $p < 0,05$ ); ^ — с контролем, + — с трамадолом (two-way ANOVA).  
**Note:** # —  $p < 0,05$ ; ## —  $p < 0,01$  (according to Fischer), statistically significant differences ( $p < 0,05$ ); ^ — with control, + — with tramadol (two-way ANOVA).

50 мг/кг — в 3,4 раза, 100 мг/кг — 3,1 раза, 200 мг/кг — 3,9 раза по сравнению с аналогичным значением контроля. Кроме того, фиксировалось увеличение латентного времени развития болевой реакции во всех исследуемых группах: 25 мг/кг — в 3,3 раза ( $p < 0,01$ ), 50 мг/кг — в 3,8 раза ( $p < 0,01$ ), 100 мг/кг — в 3,6 раза ( $p < 0,01$ ), 200 мг/кг — в 4,5 раза ( $p < 0,01$ ) относительно соответствующего значения контроля. При этом число мышей без проявления болевой реакции составило 60% (25 мг/кг,  $p < 0,01$ ), 50% (50 мг/кг,  $p < 0,01$ ), 60% (100 мг/кг,  $p < 0,01$ ), 90% (25 мг/кг,  $p < 0,01$ ) против 0% в контроле (табл. 3). Следует отметить отсутствие статистически значимых различий с аналогичными значениями группы трамадола, что свидетельствует о сопоставимости обезболивающей активности соединения и анальгетика с опиоидным компонентом механизма действия.

Курсовое в течение 3 дней ежесуточное введение соединения во всех дозах (25–200 мг/кг) *per os* приводило к выраженному антиноцицептивному действию, о чём свидетельствуют изученные показатели. Отмечалось увеличение порога болевой чувствительности: 25 мг/кг — в 2,0 раза ( $p < 0,01$ ), 50 мг/кг — в 2,1 раза ( $p < 0,01$ ), 100 мг/кг — в 2,4 раза ( $p < 0,01$ ), 200 мг/кг — в 2,2 раза ( $p < 0,01$ ) по сравнению с аналогичным значением контроля. Анализ латентного времени развития болевого ответа позволил выявить сходную направленность эффекта, т. к. фиксировалось увеличение данного показателя относительно соответствующего значения контроля в этом периоде наблюдения: 25 мг/кг — в 1,9 раза ( $p < 0,01$ ), 50 мг/кг — в 2,1 раза ( $p < 0,01$ ), 100 мг/кг — в 2,7 раза ( $p < 0,01$ ), 200 мг/кг — в 2,5 раза ( $p < 0,01$ ). Количество мышей без проявления болевой реакции составило 70% (25 мг/кг,  $p < 0,01$ ), 80% (50 мг/кг,  $p < 0,01$ ), 90% (100 мг/кг,  $p < 0,01$ ), 80% (200 мг/кг,  $p < 0,01$ ) против 9,1% контрольных животных. Отсутствовала статистически зна-

чимая разница между всеми показателями групп применения МЗ в дозах 25, 50 и 200 мг/кг и значениями группы трамадола в этот срок наблюдения (табл. 3). Выявлена преимущественная активность соединения в дозе 100 мг/кг по сравнению с трамадолом, заключающаяся в повышении латентного времени наступления болевой реакции в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) и увеличении числа мышей с максимальной экспозицией до 90% ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, в результате исследования анальгетической активности вещества МЗ в тесте «механической компрессии лапы» у аутобредных мышей-самцов CD1 при однократном и трёхдневном применении продемонстрирована антиноцицептивная активность, превосходящая в дозе 100 мг/кг при трёхсуточном применении эффект референс-препарата трамадола.

## Обсуждение результатов

Изучение спектра антиноцицептивных характеристик впервые синтезированного вещества 4-(3,4-дибромтиофенилкарбонил)-10-(2-этоксиацетил)-2, 6, 8, 12-тетраацетил-2, 4, 6, 8, 10, 12-гексаазатетрацикло[5, 5, 0, 0<sup>3,11</sup>, 0<sup>5,9</sup>]додекана (МЗ) на основе гексаазаизовюрцитана было проведено в батарее современных поведенческих тестов, моделирующих соматическую боль у животных с использованием механической компрессии лапы, термического воздействия и химического болевого раздражения брюшины [1, 8, 13]. Данная методология тестирования вещества на различных моделях, отличающихся по характеру воздействия и типу ответной реакции, позволяет сделать заключение о возможном механизме действия потенциального анальгетика. Исходя из патогенеза болевого состояния при химическом раздражении брюшины, можно сделать вывод о реализации антиноцицептивного действия МЗ на периферическом уровне, вероятно, как через ингибирование синтеза простагландинов, так и через активацию

опиоидергической системы [8, 9, 13]. С другой стороны, представленные результаты теста «механической компрессии» свидетельствуют о том, что высокая анальгетическая активность МЗ реализуется не только на периферическом, но и на супраспинальном уровнях организации болевой чувствительности. Вместе с тем выраженное антиноцицептивное действие вещества МЗ в тесте «тепловой иммерсии» хвоста, в генезе боли которого отсутствует активация терморцепторов, может реализоваться на спинальном уровне за счёт снижения возбуждения С- и Аδ-волокон полимодальных ноцицепторов, высокопороговых механорецепторов [8, 9, 13]. Полученные результаты свидетельствуют в пользу мультитаргетного механизма анальгезии новой молекулы, что определяет целесообразность дальнейшего исследования фармакодинамики и особенностей антиноцицептивной активности.

## Выводы

Впервые синтезированное соединение 4-(3,4-дибромтиофенилкарбонил)-10-(2-

этоксияцетил)-2, 6, 8, 12-тетраацетил-2, 4, 6, 8, 10, 12-гексаазатетрацикло[5, 5, 0, 0<sup>3,11</sup>, 0<sup>5,9</sup>] додекан (МЗ) при введении животным в желудок в диапазоне доз 25–200 мг/кг оказывает выраженное анальгетическое действие даже при однократном введении, сопоставимое и/или превосходящее эффекты трамадола на моделях различных ноцицептивных реакций. На основании полученных результатов можно заключить, что анальгетическое действие вещества может реализоваться за счёт ингибирующего влияния на периферические и центральные механизмы развития болевого синдрома.

Продемонстрированные результаты исследования антиноцицептивной активности нового малотоксичного вещества из класса гексаазаизовюрцитанов свидетельствуют о его высокой эффективности, что обуславливает целесообразность расширенного доклинического исследования и является доказательством возможности синтеза оригинальных низкотоксичных фармакологически активных молекул на основе высокоэнергетического вещества.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Воронина Т.А., Гузеватых Л.С. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств. *Рук-во по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А.Н. Миронова. Ч. 1. М., 2012:199–207. [Voronina T.A., Guzevatykh L.S. Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu anal'geticheskoy aktivnosti lekarstvennykh sredstv [Guidelines for the study of analgesic activity of drugs]. *Ruk-vo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs]. Ed. A.N. Mironov. Part 1. Moscow, 2012:199–207. (In Russian)].
2. Крылова С.Г., Поветьева Т.Н., Лопатина К.А., Нестерова Ю.В., Зуева Е.П., Афанасьева О.Г., Киселева Е.А., Кульпин П.В., Суслов Н.И., Кулагина Д.А., Сысолятин С.В., Жданов В.В. Риск развития лекарственной зависимости при применении нового анальгетика на основе производного гексаазаизовюрцитана (экспериментальное исследование). *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(1): 54–62. [Krylova S.G., Povetyeva T.N., Lopatina K.A., Nesterova Yu.V., Zueva E.P., Afanasyeva O.G., Kiseleva E.A., Kulpin P.V., Suslov N.I., Kulagina D.A., Sysolyatin S.V., Zhdanov V.V. Risk razvitiya lekarstvennoy zavisimosti pri primeneniі novogo anal'getika na osnove proizvodnogo geksazaizovyurtzitana (eksperimental'noe issledovanie) [Risk of developing drug abuse in administration of a new hexazaizovurtzitan derivative-based analgesic (experimental study)]. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(1):54–62. (In Russian)]. DOI: 10.20538/1682-0363-2022-1-54-62.
3. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. Учебное пособие для биологических специальных вузов. 4-изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1990. [Lakin G.F. *Biometrics*. Textbook for biological special universities. 4th ed., revised. Moscow: Vysshaya shkola Publ., 1990. (In Russian)].
4. Лемешко Б.Ю., Лемешко С.Б. Об устойчивости и мощности критериев проверки однородности средних. *Измерительная техника*. 2008;9:23–28. [Lemeshko B.Yu., Lemeshko S.B. Ob ustoychivosti i moshchnosti kriteriev proverki odnorodnosti srednikh [On the stability and power of criteria for checking the homogeneity of means]. *Izmeritel'naya*

- tehnika [Measuring technology]*. 2008;9:23–28. (In Russian)].
5. Палехов А.В., Введенская Е.С. Опиоидные анальгетики, проблемы сегодняшнего дня и поиск путей их решения. *Российский журнал боли*. 2017;3–4(54):89–94. [Palkhov A.V., Vvedenskaya E.S. Opioidnyye anal'getiki, problemy segodnyashnego dnya i poisk putey ikh resheniya [Opioid analgesics, problems of today and the search for ways to solve them]. *Rossiyskiy zhurnal boli [Russian Journal of Pain]*. 2017;3–4(54):89–94. (In Russian)].
  6. Соснов А.В., Садовников С.В., Семченко Ф.М., Руфанов К.А., Тохмахчи В.Н., Соснова А.А., Тюрин И.А. Сильнодействующие ненаркотические анальгетики как направление развития фармацевтики. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;1:196–206. [Sosnov A.V., Sadovnikov S.V., Semchenko F.M., Rufanov K.A., Tokhmakhchi V.N., Sosnova A.A., Tyurin I.A. Sil'nodeystvuyushchie nenarkoticheskie anal'getiki kak napravlenie razvitiya farmatsevtiki [Potent non-narcoticanalgesics as a direction of pharmaceutical development]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv [Drug development & registration]*. 2016;1:196–206. (In Russian)].
  7. Agüero S., Megy S., Eremina V.V., Kalashnikov A.I., Krylova S.G., Kulagina D.A., Lopatina K.A., Fournier M., Povet'eva T.N., Vorozhtsov A.B., Sysolyatin S.V., Zhdanov V.V., Terreux R. Discovery of a novel non-narcotic analgesic derived from the CL-20 explosive: Synthesis, pharmacology, and target identification of thiowurtzine, a potent inhibitor of the opioid receptors and the ion channels. *ACS Omega*. 2021;6(23):15400–15411. DOI: 10.1021/acsomega.1c01786.
  8. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012;211:39–50. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041.
  9. Katzung B.G. Basic & clinical pharmacology, 14th ed. *McGraw-Hill Education*, 2018:409–438.
  10. Krylova S.G., Lopatina K.A., Nesterova Yu.V., Povet'eva T.N., Kul'pin P.V., Afanas'eva O.G., Kulagina D.A., Safonova E.A., Zueva E.P., Suslov N.I., Sysolyatin S.V. Some aspects of investigation of the central mechanism of antinociceptive effect of a new analgetic from the hexaazaisowurtzitan group. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021;170(6):752–758. DOI: 10.1007/s10517-021-05148-w.
  11. Nijis J., George S.Z., Clauw D.J., Fernández-de-las-Peñas C., Kosek E., Ickmans K., Fernández-Carnero J., Polli A., Kapreli E., Huysmans E., Cuesta-Vargas A.I., Mani R., Lundberg M., Leysen L., Rice D., Sterling M., Curatolo M. Central sensitisation in chronic pain conditions: Latest discoveries and their potential for precision medicine. *Lancet Rheumatol*. 2021;3(5):e383–e392. DOI: 10.1016/S2665-9913(21)00032-1.
  11. Sysolyatin S.V., Lobanova A.A., Chernikova Yu.T., Sakovich G.V. Methods of synthesis and properties of hexanitrohexaazaisowurtzitan. *Russ. Chem. Rev.* 2005;74(8):757–764. DOI: 10.1070/RC2005v074n08ABEH001179.
  12. Turner P.V., Turner D.S., Pang J.L., Lofgren A. Review of pain assessment methods in laboratory rodents. *Comp. Med.* 2019;69(6):451–467. DOI: 10.30802/AALAS-CM-19-000042.
  13. Yam M.F., Loh Y.C., Tan C.S., Khadjiah Adam S., Abdul Manan N., Basir R. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(8):2164. DOI: 10.3390/ijms19082164.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Киселёва Елена Александровна**, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

**e-mail: [elena\\_kis@sibmail.com](mailto:elena_kis@sibmail.com)**

**Крылова Светлана Геннадьевна\***, д.б.н., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

**e-mail: [krylova5935@gmail.com](mailto:krylova5935@gmail.com)**

**Elena A. Kiseleva**, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail: [elena\\_kis@sibmail.com](mailto:elena_kis@sibmail.com)**

**Svetlana G. Krylova\***, Dr. Sci. (Biol.), Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail: [krylova5935@gmail.com](mailto:krylova5935@gmail.com)**

**Поветьева Татьяна Николаевна**, д.б.н., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

**e-mail:** [ptn@bk.ru](mailto:ptn@bk.ru)

**Нестерова Юлия Владимировна**, к.м.н., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

**e-mail:** [nes-yuliya@yandex.ru](mailto:nes-yuliya@yandex.ru)

**Афанасьева Ольга Геннадьевна**, к.б.н., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

**e-mail:** [olgaafanasjeva@mail.ru](mailto:olgaafanasjeva@mail.ru)

**Кульпин Павел Валерьевич**, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

**e-mail:** [pavellevap@inbox.ru](mailto:pavellevap@inbox.ru)

**Кулагина Дарья Александровна**, к.х.н., ФГБУН Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН;

**e-mail:** [imbiri@rambler.ru](mailto:imbiri@rambler.ru)

**Зуева Елена Петровна**, д.б.н., проф., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

**e-mail:** [zep0929@mail.ru](mailto:zep0929@mail.ru)

**Суслов Николай Иннокентьевич**, д.м.н., проф., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

**e-mail:** [nis-51@mail.ru](mailto:nis-51@mail.ru)

**Ерёмина Валерия Валерьевна**, к.б.н., ФГБУН Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН;

**e-mail:** [evv@ipcet.ru](mailto:evv@ipcet.ru)

**Tatyana N. Povet'eva**, Dr. Sci. (Biol.), Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [ptn@bk.ru](mailto:ptn@bk.ru)

**Yuliya V. Nesterova**, Cand. Sci. (Med.), Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [nes-yuliya@yandex.ru](mailto:nes-yuliya@yandex.ru)

**Olga G. Afanas'eva**, Cand. Sci. (Biol.), Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [olgaafanasjeva@mail.ru](mailto:olgaafanasjeva@mail.ru)

**Pavel V. Kul'pin**, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [pavellevap@inbox.ru](mailto:pavellevap@inbox.ru)

**Daria A. Kulagina**, Cand. Sci. (Chem.), Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [imbiri@rambler.ru](mailto:imbiri@rambler.ru)

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

**e-mail:** [zep0929@mail.ru](mailto:zep0929@mail.ru)

**Nikolay I. Suslov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [nis-51@mail.ru](mailto:nis-51@mail.ru)

**Valeria V. Eremina**, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [evv@ipcet.ru](mailto:evv@ipcet.ru)

**Байбакова Ольга Владимировна**, к.т.н.,  
ФГБУН Институт проблем химико-энергетиче-  
ских технологий Сибирского отделения РАН;  
[e-mail: olka\\_baibakova@mail.ru](mailto:olka_baibakova@mail.ru)

**Сысолятин Сергей Викторович**, д.х.н., проф.,  
член-корр. РАН, ФГБУН Институт проблем хи-  
мико-энергетических технологий Сибирского  
отделения РАН;  
[e-mail: admin@ipcet.ru](mailto:admin@ipcet.ru)

**Жданов Вадим Вадимович**, д.м.н., проф., член-  
корр. РАН, Научно-исследовательский институт  
фармакологии и регенеративной медицины име-  
ни Е.Д. Гольдберга, ФГБНУ «Томский националь-  
ный исследовательский медицинский центр  
РАН»;  
[e-mail: zhdanov\\_vv@pharmso.ru](mailto:zhdanov_vv@pharmso.ru)

**Olga V. Baibakova**, Cand. Sci. (Tech.), Institute  
for Problems of Chemical and Energetic Techno-  
logies of the Siberian Branch of Russian Academy  
of Sciences;  
[e-mail: olka\\_baibakova@mail.ru](mailto:olka_baibakova@mail.ru)

**Sergey V. Sysolyatin**, Dr. Sci. (Chem.), Prof., In-  
stitute for Problems of Chemical and Energetic  
Technologies of the Siberian Branch of Russian  
Academy of Sciences;  
[e-mail: admin@ipcet.ru](mailto:admin@ipcet.ru)

**Vadim V. Zhdanov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Goldberg  
Research Institute of Pharmacology and Regenerative  
Medicine, Tomsk National Research Medical Center  
of the Russian Academy of Sciences;  
[e-mail: zhdanov\\_vv@pharmso.ru](mailto:zhdanov_vv@pharmso.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА, ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА И ТКАНЕВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ НОВОГО АНТИВИРУЛЕНТНОГО СРЕДСТВА ФТОРТИАЗИНОН

М.В. Савицкий<sup>1,\*</sup>, Н.Е. Москалева<sup>1,2</sup>, Н.А. Зигангирова<sup>3</sup>, А.В. Соловьёва<sup>3</sup>,  
А.Б. Шеремет<sup>3</sup>, Н.Е. Бондарева<sup>3</sup>, Н.Л. Лубенец<sup>3</sup>, Н.В. Пятигорская<sup>1</sup>, С.А. Апполонова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)  
119991, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

<sup>2</sup> Центр цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения, ФГАОУ ВО Первый МГМУ  
им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)  
119991, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России  
123098, Российская Федерация, Москва, ул. Гамалеи, 18

В настоящем исследовании была изучена фармакокинетика, тканевое распределение и метаболизм нового лекарственного средства, обладающего антивирулентной активностью, — фтортиазинона — в крови, печени, почках и лёгких мышей после однократного внутривенного введения в дозе 400 мг/кг. Установлено, что фтортиазинон хорошо проникает в периферические ткани, длительно находится в организме и в основном метаболизируется с образованием глюкуронида фтортиазинона.

**Ключевые слова:** фтортиазинон, фармакокинетика, тканевая доступность, ВЭЖХ-МС/МС, глюкуроноид

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** работа профинансирована Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития исследовательских центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» (соглашение № 075-15-2022-304).

**Для цитирования:** Савицкий М.В., Москалева Н.Е., Зигангирова Н.А., Соловьёва А.В., Шеремет А.Б., Бондарева Н.Е., Лубенец Н.Л., Пятигорская Н.В., Апполонова С.А. Экспериментальная фармакокинетика, изучение метаболизма и тканевого распределения нового антивирулентного средства фтортиазинон. *Биомедицина*. 2023;19(1):73–84. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-73-84>

Поступила 17.08.2022

Принята после доработки 06.10.2022

Опубликована 10.03.2023

## EXPERIMENTAL PHARMACOKINETICS, METABOLISM AND TISSUE DISTRIBUTION STUDIES OF FLUOROTHIAZINON, A NOVEL ANTIVIRULENCE DRUG

Mark V. Savitskii<sup>1,\*</sup>, Natalia E. Moskaleva<sup>1,2</sup>, Nailya A. Zigangirova<sup>3</sup>, Anna V. Soloveva<sup>3</sup>,  
Anna B. Sheremet<sup>3</sup>, Natalia E. Bondareva<sup>3</sup>, Nadezhda L. Lubenec<sup>3</sup>,  
Natalia V. Pyatigorskaya<sup>1</sup>, Svetlana A. Appolonova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)  
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8, build. 2

<sup>2</sup> World-Class Research Centers of Digital Biodesign and Personalized Healthcare,  
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)  
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8, build. 2

<sup>3</sup> National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya  
of the Ministry of Health Care of Russia  
123098, Russian Federation, Moscow, Gamalei Str., 18

We studied the pharmacokinetics, tissue availability and metabolism of fluorothiazinon, a novel antiviral drug, in mouse blood, liver, kidneys and lungs by administering the substance intragastrically at dose of 400 mg/kg. Fluorothiazinon was established to exhibit good tissue availability and long residential time. This drug is metabolized mainly by glucuronidation.

**Keywords:** fluorothiazinon, pharmacokinetics, tissue distribution, HPLC-MS/MS

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

**Funding:** the work was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of a World-Class Research Centers “Digital Biodesign and Personalized Healthcare” No. 075-15-2022-304.

**For citation:** Savitskii M.V., Moskaleva N.E., Zigangirova N.A., Soloveva A.V., Sheremet A.B., Bondareva N.E., Lubenec N.L., Pyatigorskaya N.V., Appolonova S.A. Experimental Pharmacokinetics, Metabolism and Tissue Distribution Studies Fluorothiazinon, a of Novel Antiviral Drug. *Journal Biomed.* 2023;19(1):73–84. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-73-84>

Submitted 17.08.2022

Revised 06.10.2022

Published 10.03.2023

## Введение

В ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» был разработан новый антивирулентный препарат фтортиазинон (ФТ) (4-(3-этоксипропан-2-ил)-5-оксо-5,6-дигидро-4Н-[1,3,4]-тиадиазин-2-(2,4-дифторфенил)-карбоксамид) (рис. 1) — низкомолекулярный ингибитор системы секреции третьего типа, фактора вирулентности многих патогенных грамотрицательных бактерий. Подобные антивирулентные средства лишают бактерии патогенных свойств, благодаря чему такие бактерии теряют свою способность инфицировать и размножаться в организме, чем отличаются от антибиотиков, которые оказывают селективное давление на жизнедеятельность патогенов [2]. В долгосрочной перспективе антивирулентные средства могут преодолеть распространяющуюся антибиотикорезистентность инфекционных возбудителей, а также ограничить распространение вирулентных генов [7]. ФТ показал свою *in vivo* и *in vitro* активность в отношении *Chlamydia trachomatis*,

*Salmonella enterica* серовар *Typhimurium*, а также мультирезистентных *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* [4, 6, 11–14].

Важной частью доклинических и клинических исследований оригинального лекарственного средства является изучение его фармакокинетики — количественной характеристики процессов всасывания, распределения, метаболизма и экскреции. Впервые фармакокинетика ФТ была исследована на мышах при внутрибрюшинном введении в дозе 100 мг/кг и на кроликах при внутривенном и пероральном введении в дозе 50 мг/кг [6, 13]. На основании полученных данных были установлены общие закономерности фармакокинетики фтортиазинона, заключающиеся в длительном нахождении в системном кровотоке и большом периоде полувыведения. Тем не менее, многие вопросы, связанные с метаболизмом и распределением ФТ по органам и тканям, оставались открытыми.

**Целью работы** являлось изучение фармакокинетики, тканевого распределения и биотрансформации препарата ФТ после однократного внутривидового введения мышам.

## Материалы и методы

### Реактивы

Стандартные образцы субстанции ФТ, таблетки ФТ и внутреннего стандарта CL-130 (4-(3-этокси-4-гидроксибензил)-5-оксо-5,6-дигидро-4Н-[1,3,4]-тиадиазин-2-(2,4-трифторфенил)-карбоксамид) предоставлены ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ.

Деионизированная вода была получена при помощи установки Milli-Q («Merck KGaA», Германия). Для приготовления подвижной фазы использована муравьиная кислота (98%) «Panreac AppliChem» (США) и ацетонитрил «Chromasolv» (Германия). Ферментативный гидролиз проводился при помощи β-глюкуронидазы (*E. coli K12*) («Roche», Швейцария). Для приготовления буфера использованы калия дигидрофосфат, натрия фосфат двухосновный и азид натрия квалификации «чистые для анализа».

### Лабораторные животные

Исследование проведено на взрослых мышах-самцах линии DBA массой тела 24–26 г. Животных содержали в лабораторном виварии при температуре 20–24 °С, относительной влажности воздуха 45–65% в клетках из поликарбоната со стальными решетчатыми крышками по 5 особей. Мыши получали корм без ограничения и имели свободный доступ к воде. Все манипуляции с животными проводили в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986). Исследование было одобрено Этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи».

### Исследование фармакокинетики фтортиазинона

Для изучения фармакокинетики и тканевой доступности мышам давали препарат ФТ (таблетки) в дозе 400 мг/кг по действующему веществу в виде суспензии в воде

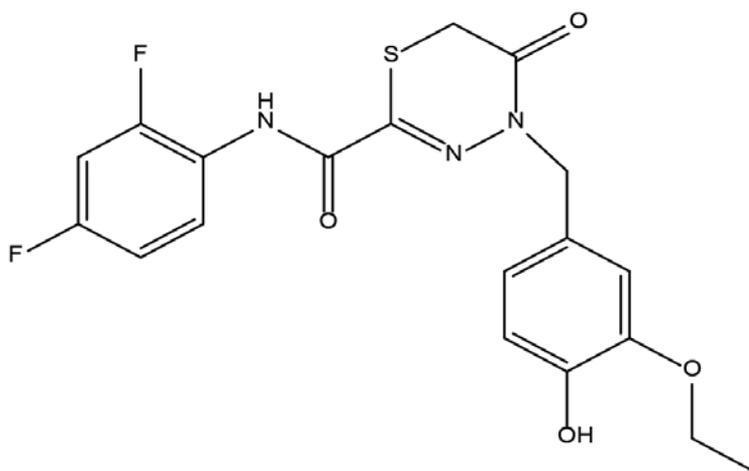


Рис. 1. Структурная формула фтортиазинона (ФТ).  
Fig. 1. Skeletal formula of fluorothiazinon (FT).

посредством принудительного выпаивания через желудочный зонд. Содержание ФТ определяли через 0,5; 1; 2; 4; 8; 12 и 24 ч после введения в цельной крови, печени, почках и лёгких мышей.

Отбор образцов цельной крови производили из сердца в объёме не менее 500 мкл в пробирки с антикоагулянтом и замораживали. Органы промывали дистиллированной водой, просушивали фильтровальной бумагой, взвешивали, помещали в пробирки для гомогенизации с матриксом для измельчения и добавляли физ. р-р в количестве 50% от объёма органа и гомогенизировали с использованием прибора MP Bio Fast Prep («MP Biomedicals», США). Образцы крови, печени, почек и лёгких были получены после декапитации животных. На каждую дискретную точку использовали по 5 животных.

#### **Количественное определение фтортиазинона**

Хромато-масс-спектрометрический анализ был выполнен на жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity II («Agilent Corp.», США), объединённом с тандемным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Agilent 6470 («Agilent Corp.», США).

Для хроматографического разделения была использована аналитическая колонка Acquity UPLC VEN C18 (2,1×50 мм; 1,7 мкм) («Waters Corp.», США), температура колонки 40 °С. В качестве подвижной фазы были использованы 0,1% водный р-р муравьиной кислоты и ацетонитрил. Градиентное элюирование было выполнено следующим образом: 0,1 мин (10% В); 3,0 мин (55% В); 4,1 мин (90% В); 5,1 мин (10% В). Общее время анализа составило 7,0 мин. Скорость потока подвижной фазы — 0,3 мл/мин. Объём вводимой пробы — 3 мкл.

Масс-спектры были получены в режиме положительной ионизации в электро-спрее методом мониторинга множественных реакций (MRM). Параметры

детектора были следующими: температура источника — 150 °С, температура десольватации — 350 °С, скорость потока газа на конусе — 50 л/ч, скорость потока газа десольватации — 650 л/ч, напряжение капилляра — 4,0 кВ. Идентификация аналитов осуществлялась на основе установления характеристичных переходов: ФТ —  $m/z$  422,0 → 151,1 и 422 → 123,0; CL-130 —  $m/z$  440,2 → 151,1. Время удерживания ФТ составило 3,5 мин, CL-130 — 3,7 мин.

Для количественного определения был использован метод внутреннего стандарта. Калибровочный диапазон составил 0,1–20 000 нг/мл. Образцы контроля качества были приготовлены на трёх уровнях концентрации так же, как и образцы калибровочных стандартов. Разработанный метод был валидирован согласно требованиям к валидации биоаналитических методов ЕАЭС, руководствам FDA и ЕМЕА.

#### **Пробоподготовка**

В пластиковую пробирку на 1,5 мл помещают 10 мкл рабочего р-ра внутреннего стандарта CL-130, 100 мкл анализируемого биообъекта и прибавляют 100 мкл фосфатного буферного р-ра. Затем добавляют 400 мкл ацетонитрила и перемешивают на вортексе. Пробу центрифугируют в течение 10 мин при 14 000 об./мин. 400 мкл надосадочной жидкости переносят в чистую пробирку и упаривают досуха в центрифужном концентраторе при температуре 40 °С. Сухой остаток перерастворяют в 100 мкл ацетонитрила, перемешивают и переносят в микровиалы для последующего хромато-масс-спектрометрического анализа.

Для определения глюкуронида проводили ферментативный гидролиз при помощи β-глюкуронидазы (*E. coli K12*). Для этого после к пробе добавляли р-р β-глюкуронидазы (*E. coli K12*) в фосфатном буфере и инкубировали при 37 °С в течение 4 ч. Затем добавляют 400 мкл ацетонитрила и перемешивают на вортексе. Пробу центрифуги-

руют в течение 10 мин при 14 000 об./мин. 400 мкл надосадочной жидкости переносят в чистую пробирку и упаривают досуха в центрифужном концентраторе при температуре 40 °С. Сухой остаток перерастворяют в 100 мкл ацетонитрила, перемешивают и переносят в микровials для последующего хромато-масс-спектрометрического анализа.

### Фармакокинетические параметры, используемые для интерпретации экспериментальных данных

Основные фармакокинетические параметры рассчитаны при помощи программы PKSolver для Excel некомпартментным способом и методом Linear Trapezoidal:  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ,  $AUC_{0 \rightarrow t}$ ,  $K_{el}$ ,  $T_{1/2}$ ,  $AUMC_{0 \rightarrow \infty}$ ,  $AUMC_{0 \rightarrow t}$ , MRT.

Также для описания распределения ФТ по органам был рассчитан показатель тканевая доступность  $f_T$ , рассчитываемый как  $f_T = AUC_T / AUC_K$ , где  $AUC_T$  —  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  вещества в ткани,  $AUC_K$  —  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  вещества в крови.

В качестве характеристики всасывания ФТ из желудочно-кишечного тракта было принято отношение  $C_{max} / AUC_{0-t}$ .

## Результаты исследований

### Фармакокинетика фтортиазиона

Усреднённый фармакокинетический профиль ФТ в крови после однократного внутрижелудочного введения препарата ФТ в дозе 400 мг/кг представлен на рис. 2. Поскольку на каждую временную точку использовали по 5 животных, результирующая фармакокинетическая кривая была построена по усреднённым концентрациям, поэтому при расчётах фармакокинетических параметров отсутствует статистическая обработка результатов.

Фармакокинетические параметры исследуемого соединения в цельной крови животных представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, ФТ всасывается из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) со скоростью 0,13 ч<sup>-1</sup> ( $C_{max} / AUC_{0-t}$ ) и определяется в цельной крови на протяжении

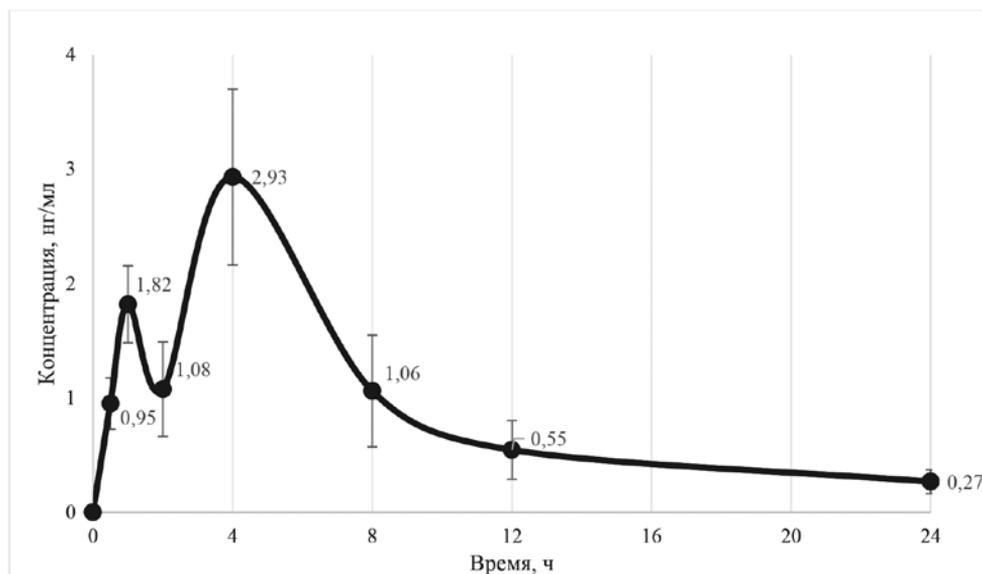


Рис. 2. Усреднённый фармакокинетический профиль фтортиазиона в цельной крови мышей.  
Fig. 2. Average pharmacokinetic profile of fluorothiazinon in the whole blood of mice.

**Таблица 1.** Фармакокинетические параметры фтортиазинона в цельной крови мышей

**Table 1.** Pharmacokinetic parameters of fluorothiazinon in the whole blood of mice

Параметр	Значение
С <sub>max1</sub> , нг/мл	1,82
С <sub>max2</sub> , нг/мл	2,93
Т <sub>max1</sub> , ч	1,0
Т <sub>max2</sub> , ч	4,0
AUC <sub>0→t</sub> , нг/мл×ч	22,47
AUC <sub>0→∞</sub> , нг/мл×ч	25,81
k <sub>el</sub> , ч <sup>-1</sup>	0,080
t <sub>1/2</sub> , ч	8,7
AUMC <sub>0→t</sub> , нг/мл×ч <sup>2</sup>	164,90
AUMC <sub>0→∞</sub> , нг/мл×ч <sup>2</sup>	287,13
MRT <sub>0→t</sub> , ч	7,34
C <sub>max</sub> /AUC <sub>0→t</sub> , ч <sup>-1</sup>	0,13

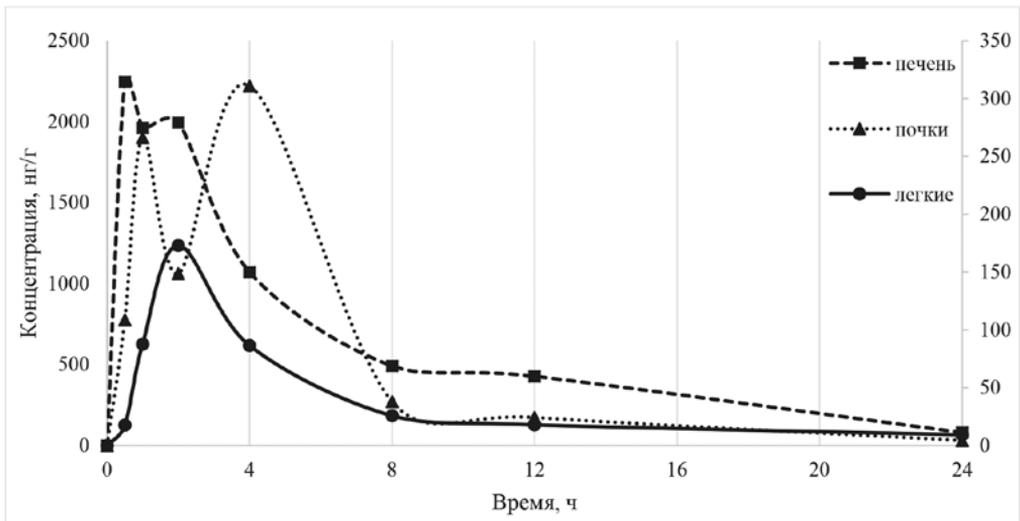
нии 24 ч. Кинетика ФТ в цельной крови мышей в данном эксперименте характеризуется наличием двух пиков концентрации. Первый пик концентрации наблюдается через 1 ч после введения вещества, второй пик — через 4,0 ч после введения вещества.

Разница между двумя пиками концентрации составила 3 ч. Учитывая, что период полуэлиминации составил 8,7 ч, ФТ можно считать препаратом, который медленно выводится из организма. Также среднее время удерживания вещества в организме (MRT=7,34 ч) указывает на длительное нахождение исследуемого вещества в системном кровотоке животных.

### Распределение фтортиазинона по органам мышей

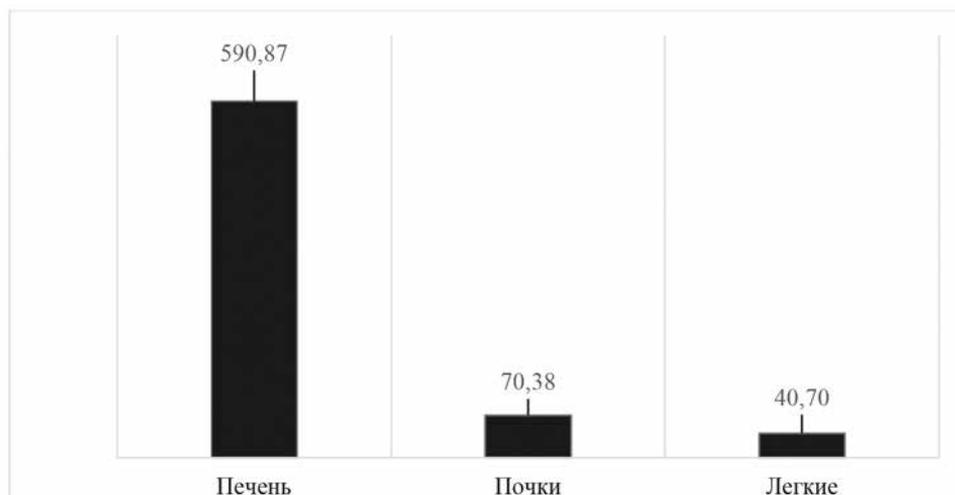
Распределение субстанции ФТ изучали в органах и тканях, отличавшихся друг от друга различной степенью кровоснабжения и обеспечивающих элиминацию: печень, почки и лёгкие. ФТ наблюдается во всех исследуемых органах, в распределении препарата по органам прослеживается значительная гетерогенность. Усреднённые фармакокинетические профили ФТ в печени, почках и лёгких мышей представлены на рис. 3.

Чтобы оценить интенсивность проникновения исследуемого вещества в перифе-



**Рис. 3.** Усреднённые фармакокинетические профили фтортиазинона в органах мышей. Концентрация ФТ в печени изменяется по основной оси (слева), концентрация ФТ в почках и лёгких изменяется по вспомогательной оси (справа).

**Fig. 3.** Average pharmacokinetic profiles of fluorothiazinon in the organs of mice. Concentration of FT in liver is plotted on the primary axis (left). Concentrations of FT in kidneys and lungs are plotted on the secondary axis (right).



**Рис. 4.** Тканевая доступность фтортиазинона в печени, почках и лёгких мышей.  
**Fig. 4.** Tissue availability of fluorothiazinon in the liver, kidneys and lungs of mice.

рические ткани, был рассчитан показатель «тканевая доступность», результаты представлены на рис. 4.

Фармакокинетические параметры исследуемого соединения в цельной крови животных представлены в табл. 2.

После однократного внутривенного введения ФТ определяется печень, почках и лёгких мышей на протяжении 24 ч.

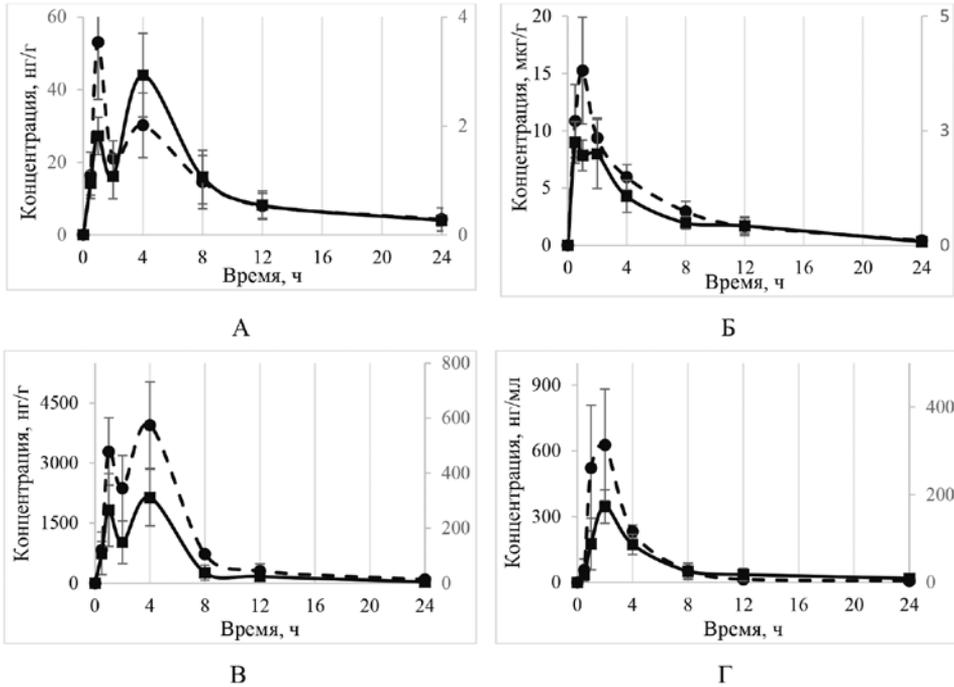
**Таблица 2.** Фармакокинетические параметры фтортиазинона в цельной крови и в органах мышей  
**Table 2.** Pharmacokinetic parameters of fluorothiazinon in the whole blood and organs of mice

Параметры	Органы и ткани		
	печень	почки	лёгкое
С <sub>max</sub> 1, нг/г	2247,00	266,13	172,99
С <sub>max</sub> 2, нг/г	1994,59	311,05	–
Т <sub>max</sub> 1, ч	0,5	1,0	2,0
Т <sub>max</sub> 2, ч	2,0	4,0	–
AUC, нг/г×ч	15252,74	1816,87	1050,52
AUC <sub>0–t</sub> , нг/г×ч	14677,70	1784,07	897,76
k <sub>el</sub> , ч <sup>-1</sup>	0,141	0,136	0,061
t <sub>1/2</sub> , ч	4,92	5,10	11,30
AUMC, нг/г×ч <sup>2</sup>	107238,07	9633,51	11690,93
AUMC <sub>0–t</sub> , нг/г×ч <sup>2</sup>	89351,13	8604,92	5533,85
MRT, ч	6,09	4,82	6,16

Из рис. 3 видно, что кинетика фтортиазинона в печени и почках характеризуется наличием двух пиков концентрации, в отличие от лёгких, где наблюдается один пик концентрации вещества. Время достижения пиковых концентраций в исследуемых органах также различно. Тканевая доступность фтортиазинона для исследуемых органов повышается в ряду «лёгкие — почки — печень», что говорит о хорошем проникновении ФТ в органы. Соответственно, ФТ интенсивно распределяется во все исследованные органы, длительно удерживаясь в лёгких.

### Исследование биотрансформации фтортиазинона

При анализе биологических образцов был обнаружен пик, который отсутствовал при анализе стандартных образцов и в дальнейшем был охарактеризован как глюкуронид фтортиазинона с характерным переходом иона с отношением массы к заряду m/z 615,1 к иону с отношением массы к заряду m/z 422,1. Поэтому с целью исследования биотрансформации фтортиазинона в процесс пробоподготовки был добавлен этап ферментативного гидро-



**Рис. 5.** Графики усреднённых фармакокинетических профилей фтортиазинона в цельной крови (А), печени (Б), почках (В) и лёгких (Г) мышей без обработки  $\beta$ -глюкуронидазой (сплошная линия, вспомогательная ось) и после ферментативного гидролиза (пунктирная линия, основная ось).  
**Fig. 5.** Plots of average pharmacokinetic profiles of fluorothiazinon in the whole blood (А), liver (Б), kidneys (В) and lungs (Г) of mice in untreated with glucuronidase samples (solid line, secondary axis) and after enzymatic hydrolysis (dashed line, primary axis).

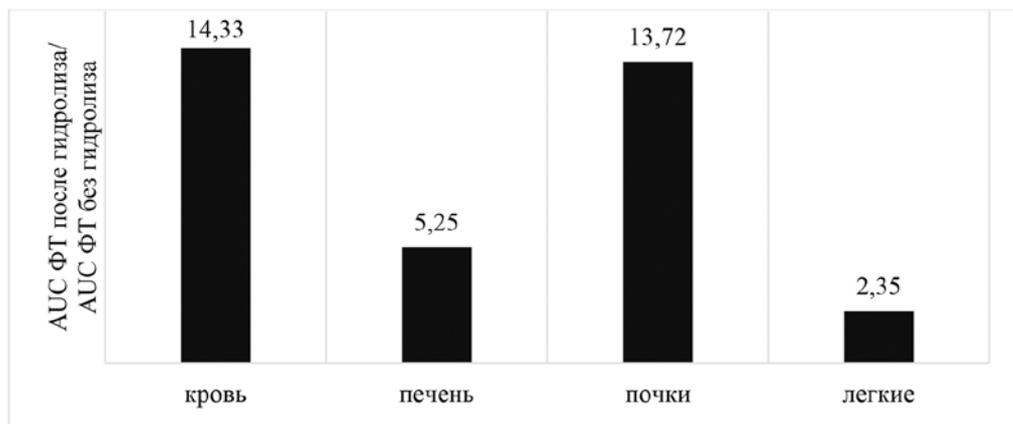
лиза  $\beta$ -глюкуронидазой *E. coli* K12. Таким образом, можно оценить роль глюкуроноконъюгации в процессах биотрансформации ФТ в организме, т. к. после гидролиза становится возможным определить общее количество исследуемого вещества в биологических пробах за счёт высвобождения той части ФТ, которая была связана с остатком глюкуроновой кислоты.

Было установлено, что в результате гидролиза глюкуроновых конъюгатов увеличивается количество определяемой концентрации фтортиазинона, что говорит о значительной доле образования глюкуронидов при биотрансформации фтортиазинона в организме. Сравнительные усреднённые фармакокинетические профили ФТ в исследуемых органах и тканях мышей

без обработки  $\beta$ -глюкуронидазой и после гидролиза представлены на рис. 5.

На рис. 6 представлено отношение AUC ФТ после ферментативного гидролиза к AUC ФТ в нативных пробах в исследуемых органах и тканях.

При сравнительном анализе усреднённых фармакокинетических профилей ФТ, полученных без обработки  $\beta$ -глюкуронидазой и после ферментативного гидролиза, нами было отмечено, что на фармакокинетических профилях ФТ для образцов крови и почек сохраняются два концентрационных максимума ФТ (рис. 5А, В), а для образцов лёгких на профиле ФК сохраняется один концентрационный максимум ФТ (рис. 5Г). При этом фармакокинетические профили ФТ в образцах печени, получен-



**Рис. 6.** Отношение AUC фтортиазинона после ферментативного гидролиза к AUC фтортиазинона без обработки глюкононидазой в органах и тканях мышей.

**Fig. 6.** The AUC of fluorothiazinon after enzymatic hydrolysis to that of fluorothiazinon in untreated with glucuronidase samples ratio in the organs and tissues of mice.

ных без обработки  $\beta$ -глюкононидазой и после ферментативного гидролиза, отличаются. Как видно на рис. 5Б, после проведения ферментативного гидролиза второго концентрационного максимума ФТ не наблюдается, что коррелирует с данными по рассчитанным нами соотношениям AUC ФТ (после гидролиза)/AUC ФТ (без гидролиза). Так, из представленной на рис. 6 диаграммы мы видим, что наибольшего значения данное соотношение достигает в крови и почках, где фармакокинетические профили ФТ сохраняются, однако в печени и лёгких, где наблюдается один концентрационный максимум ФТ, соотношение относительно меньше.

### Обсуждение результатов

Изучена фармакокинетика нового антивирулентного лекарственного средства фтортиазинон с учётом распределения вещества по тканям и его биотрансформации после однократного внутривенного введения в дозе 400 мг/кг мышам. Были определены основные фармакокинетические параметры.

Новые сведения о фармакокинетике ФТ не только согласуются с ранее полученными

данными [6, 13], но и дополняют их, т. к. впервые были исследованы распределение ФТ по органам и его биотрансформация. Было установлено, что действующее вещество ФТ — это соединение, которое медленно всасывается, хорошо проникает в исследуемые органы и длительно выводится. Также было выявлено, что глюкуроноконъюгация играет значительную роль в биотрансформации фтортиазинона.

Фармакокинетика ФТ в крови, печени и почках характеризуется наличием двух пиков концентрации. Такое явление описано в литературе как «феномен двух пиков» (Double Peak Phenomenon). Поскольку в исследовании был выбран внутривенный способ введения как наиболее близкий и эффективный аналог перорального введения, описанное явление может возникать по следующим причинам:

1) кишечно-печёночная рециркуляция. При кишечно-печёночной рециркуляции вещество связывается с желчью и включается в обмен желчных кислот в печени. Далее соединение или его метаболит конъюгирует с желчными кислотами в печени и деконъюгирует в просвете тонкого кишечника [9];

2) неравномерная абсорбирующая способность отделов ЖКТ по отношению к ФТ. Всасывание вещества происходит неоднородно и определяется свойствами вещества и от рН отдела ЖКТ, поэтому абсорбция соединений может протекать более интенсивно в одном отделе относительно другого [5];

3) флуктуации активности мышечного аппарата желудка. Доля вещества, которая всасывается в желудке, определяется тем временем, что вещество проводит в ЖКТ, что связано со скоростью опорожнения желудка и активностью мышечного аппарата ЖКТ [8]. Данный фактор имеет решающее значение для тех соединений, которые могут влиять на мышечную активность, например, кломипрамин и десметилкломипрамин [3].

В случае фтортиазинона изменение мышечной активности желудка, скорее всего, не применимо для объяснения двух пиков концентраций, т. к. действие препарата не связано с воздействием на мышечную работу.

Довольно часто наличие двух пиков концентрации связано с различной абсорбцией соединений в отделах ЖКТ. Например, два пика концентрации при пероральном приеме феназопиридина было связано с различной абсорбцией препарата в отделах тонкого кишечника [10]. Изучив влияние рН среды на кинетику растворения фтортиази-

нона, можно было бы оценить роль неравномерного всасывания препарата в ЖКТ.

Кишечно-печёночная рециркуляция представляется возможной версией, в пользу которой говорит тот факт, что в печени определяется большое количество ФТ и его глюкуронида.

Другой особенностью фармакокинетики ФТ является низкое количество вещества, определяемого в крови. Вероятно, вещество подвергается эффекту «первого прохождения», когда экзогенное соединение в значительной степени метаболизируется печенью перед попаданием в системный кровоток.

Значения тканевой доступности указывают, что ФТ также интенсивно проникает в печень и почки. Поэтому можно считать, что существенными путями элиминации ФТ будут почечная и печёночная экскреция. Высокая степень образования глюкуроноконъюгатов в почках объясняется тем, что зачастую такие метаболиты более гидрофильны и, следовательно, выводятся с мочой.

Поскольку ФТ в значительной степени образуют глюкуроноконъюгаты, то для детального исследования биотрансформации фтортиазинона в живом организме также необходимо провести встречный синтез глюкуронида фтортиазинона и количественно оценить изменение его концентрации с течением времени после введения препарата.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Bondareva N.E., Soloveva A.V., Sheremet A.B., Koroleva E.A., Kapotina L.N., Morgunova E.Y., Luyksaar S.I., Zayakin E.S., Zigangirova N.A. Preventative treatment with Fluorothiazinon suppressed *Acinetobacter baumannii*-associated septicemia in mice. *J. Antibiot.* (Tokyo). 2022;75(3):155–163. DOI: 10.1038/s41429-022-00504-y.
2. Calvert M.B., Jumde V.R., Titz A. Pathoblockers or antivirulence drugs as a new option for the treatment of bacterial infections. *Beilstein J. Org. Chem.* 2018;14:2607–2617. DOI: 10.3762/bjoc.14.239.
3. Godfrey K.R., Arundel P.A., Dong Z., Bryant R. Modelling the Double Peak Phenomenon in pharmacokinetics. *Comput. Methods Programs Biomed.* 2011;104(2):62–69. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.03.007.
4. Koroleva E.A., Kobets N.V., Zayakin E.S., Luyksaar S.I., Shabalina L.A., Zigangirova N.A. Small molecule inhibitor of type three secretion suppresses acute and chronic *Chlamydia trachomatis* infection in a novel urogenital *Chlamydia* model. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015: 484853. DOI: 10.1155/2015/484853.
5. Murakami T. Absorption sites of orally administered drugs in the small intestine. *Expert Opin. Drug Discov.* 2017;12(12):1219–1232. DOI: 10.1080/17460441.2017.1378176.

- Nesterenko L.N., Zigangirova N.A., Zayakin E.S., Luyksaar S.I., Kobets N.V., Balunets D.V., Shabalina L.A., Bolshakova T.N., Dobrynya O.Y., Gintsburg A.L. A small-molecule compound belonging to a class of 2,4-disubstituted 1,3,4-thiadiazine-5-ones suppresses Salmonella infection *in vivo*. *J. Antibiot.* (Tokyo). 2016;69(6):422–427. DOI: 10.1038/ja.2015.131.
- Ogawara H. Possible drugs for the treatment of bacterial infections in the future: Anti-virulence drugs. *J. Antibiot.* (Tokyo). 2021;74(1):24–41. DOI: 10.1038/s41429-020-0344-z.
- Ogungbenro K., Pertinez H., Aarons L. Empirical and semi-mechanistic modelling of double-peaked pharmacokinetic profile phenomenon due to gastric emptying. *AAPS J.* 2015;17(1):227–336. DOI: 10.1208/s12248-014-9693-5.
- Roberts M.S., Magnusson B.M., Burczynski F.J., Weiss M. Enterohaptic circulation. *Clin. Pharmacokinet.* 2002;41(10):751–790. DOI: 10.2165/00003088-200241100-00005.
- Shang E., Xiang B., Liu G., Xie S., Wei W., Lu J. Determination of phenazopyridine in human plasma via LC-MS and subsequent development of a pharmacokinetic model. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005;382(1):216–222. DOI: 10.1007/s00216-005-3197-1.
- Sheremet A.B., Zigangirova N.A., Zayakin E.S., Luyksaar S.I., Kapotina L.N., Nesterenko L.N., Kobets N.V., Gintsburg A.L. Small molecule inhibitor of type three secretion system belonging to a class 2,4-disubstituted-4H-[1,3,4]-thiadiazine-5-ones improves survival and decreases bacterial loads in an airway *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Biomed. Res. Int.*, 2018:5810767. DOI: 10.1155/2018/5810767.
- Zigangirova N.A., Kost E.A., Didenko L.V., Kapotina L.N., Zayakin E.S., Luyksaar S.I., Morgunova E.Y., Fedina E.D., Artyukhova O.A., Samorodov A.V., Kobets N.V. A small-molecule compound belonging to a class of 2,4-disubstituted 1,3,4-thiadiazine-5-ones inhibits intracellular growth and persistence of *Chlamydia trachomatis*. *J. Med. Microbiol.* 2016;65(1):91–98. DOI: 10.1099/jmm.0.000189.
- Zigangirova N.A., Nesterenko L.N., Sheremet A.B., Soloveva A.V., Luyksaar S.I., Zayakin E.S., Balunets D.V., Gintsburg A.L. Fluorothiazinon, a small-molecular inhibitor of T3SS, suppresses salmonella oral infection in mice. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2021;74(4):244–254. DOI: 10.1038/s41429-020-00396-w.
- Zigangirova N.A., Zayakin E.S., Kapotina L.N., Kost E.A., Didenko L.V., Davydova D.Y., Rumyancheva J.P., Gintsburg A.L. Development of chlamydial type III secretion system inhibitors for suppression of acute and chronic forms of chlamydial infection. *Acta Naturae*. 2012;4(2):87–97.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Савицкий Марк Владиславович\***, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);

[e-mail: savitsky.mark@gmail.com](mailto:savitsky.mark@gmail.com)

**Москалева Наталья Евгеньевна**, к.б.н., ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Центр цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);

[e-mail: nemoskaleva@gmail.com](mailto:nemoskaleva@gmail.com)

**Зигангирова Наиля Ахатовна**, д.б.н., ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России;

[e-mail: zigangirova@mail.ru](mailto:zigangirova@mail.ru)

**Соловьёва Анна Владимировна**, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России;

[e-mail: ufox23@gmail.com](mailto:ufox23@gmail.com)

**Mark V. Savitskii\***, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University);

[e-mail: savitsky.mark@gmail.com](mailto:savitsky.mark@gmail.com)

**Natalia E. Moskaleva**, Cand. Sci. (Biol.), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); World-Class Research Centers of Digital Biodesign and Personalized Healthcare», I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University);

[e-mail: nemoskaleva@gmail.com](mailto:nemoskaleva@gmail.com)

**Nailya A. Zigangirova**, Dr. Sci. (Biol.), National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia;

[e-mail: zigangirova@mail.ru](mailto:zigangirova@mail.ru)

**Anna V. Soloveva**, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia;

[e-mail: ufox23@gmail.com](mailto:ufox23@gmail.com)

**Шеремет Анна Борисовна**, к.б.н., ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России;  
[e-mail: anna-pimenova@mail.ru](mailto:anna-pimenova@mail.ru)

**Бондарева Наталия Евгеньевна**, к.м.н., ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России;  
[e-mail: nataliia.d@mail.ru](mailto:nataliia.d@mail.ru)

**Лубенец Надежда Леонидовна**, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России;  
[e-mail: nlubenec@mail.ru](mailto:nlubenec@mail.ru)

**Пятигорская Наталья Валерьевна**, член-корр. РАН, д.фарм.н., проф., ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);  
[e-mail: osipova-mma@list.ru](mailto:osipova-mma@list.ru)

**Апполонова Светлана Александровна**, к.х.н., ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);  
[e-mail: appolosa@yandex.ru](mailto:appolosa@yandex.ru)

**Anna B. Sheremet**, Cand. Sci. (Biol.), National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia;  
[e-mail: anna-pimenova@mail.ru](mailto:anna-pimenova@mail.ru)

**Natalia E. Bondareva**, Cand. Sci. (Med.), National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia;  
[e-mail: nataliia.d@mail.ru](mailto:nataliia.d@mail.ru)

**Nadezhda L. Lubenec**, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya of the Ministry of Health Care of Russia;  
[e-mail: nlubenec@mail.ru](mailto:nlubenec@mail.ru)

**Natalia V. Pyatigorskaya**, Corresponding Member of the RAS, Dr. Sci. (Pharm.), Prof., I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University);  
[e-mail: osipova-mma@list.ru](mailto:osipova-mma@list.ru)

**Svetlana A. Appolonova**, Cand. Sci. (Chem.), I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University);  
[e-mail: appolosa@yandex.ru](mailto:appolosa@yandex.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ УРЕТАНА И СЕЛЕНА

Н.Ю. Тимофеева\*, Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко, Н.В. Бубнова, О.Ю. Кострова,  
И.С. Стоменская, А.А. Котёлкина

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

Надпочечники являются одними из первых органов, реагирующих на воздействия внешних факторов. Кортизол, обладая важными свойствами влияния на состояние иммунной системы, процессы пролиферации и апоптоза в различных тканях, является значимым показателем такого патологического процесса, как злокачественный рост. Селен является мощным антиоксидантом, обладает иммуномодулирующим действием и проявляет антиканцерогенное воздействие. Главной целью данного исследования было изучение морфофункциональных изменений надпочечников в условиях экспериментального канцерогенеза на фоне введения уретана и селена путём определения концентрации кортизола в крови и изучения совокупного морфометрического показателя надпочечников. В ходе исследования выявлено, что введение канцерогена имитирует развитие в организме фаз адаптационного синдрома и сопровождается изменением уровня кортизола и совокупного морфометрического показателя. Максимальные цифры исследуемых показателей определяются через 1 мес. после введения канцерогена, что отражает развитие фазы тревоги. Дальнейшее снижение показателей через 2 и 3 мес. до уровня интактных говорит о развитии фазы резистентности, а резкое уменьшение показателей через 6 мес. — фазы истощения. Изолированное курсовое введение селена приводит к достоверному снижению совокупного морфометрического показателя практически на всех сроках, что указывает на антистрессорное воздействие микроэлемента. При сочетанном воздействии селена и канцерогена выявлено выпадение фазы тревоги, однако быстрая элиминация микроэлемента из организма не смогла предотвратить развитие фазы истощения через 6 мес.

**Ключевые слова:** кортизол, совокупный морфометрический показатель, надпочечники, уретан, селен, стресс

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Тимофеева Н.Ю., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Бубнова Н.В., Кострова О.Ю., Стоменская И.С., Котёлкина А.А. Морфофункциональное состояние надпочечников крыс при введении уретана и селена. *Биомедицина*. 2023;19(1):85–94. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-85-94>

Поступила 18.05.2022

Принята после доработки 13.02.2023

Опубликована 10.03.2023

## MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE ADRENAL GLANDS IN RATS UNDER URETHANE AND SELENIUM ADMINISTRATION

Natalia Yu. Timofeeva\*, Larisa M. Merkulova, Gleb Yu. Struchko, Natalia V. Bubnova,  
Olga Yu. Kostrova, Irina S. Stomenskaya, Anastasiia A. Kotelkina

I.N. Ulyanov Chuvash State University  
428015, Russian Federation, Cheboksary, Moskovskoy Ave., 15

The adrenal gland is one of the first organs to respond to external influences. Cortisol, with its important properties affecting the immune system, proliferation and apoptosis in various tissues, is a significant indicator of such a pathological process as malignant growth. Selenium is a powerful antioxidant having

an immunomodulatory action and exhibiting anticarcinogenic effects. In this paper, we investigate adrenal morphofunctional changes under experimental carcinogenesis against the background of urethane and selenium administration by determining blood cortisol concentrations and studying the aggregate morphometric index of adrenal glands. The study revealed that carcinogen introduction imitates the adaptation syndrome stages in the organism and is accompanied by changes in the cortisol level and aggregate morphometric index. Maximal values of the studied parameters were detected after 1 month of exposure to carcinogen, which indicated the development of the alarm phase. A further decrease in the indices after 2 and 3 months down to the intact level indicates the development of the resistance stage. A sharp decrease in the indices after 6 months shows the exhaustion stage. An isolated course introduction of selenium leads to a reliable decrease in the aggregate morphometric index practically in all terms that indicates the stress-relieving influence of the microelement. The combined effects of selenium and carcinogen revealed a dropout of the alarm stage, but rapid elimination of the micronutrient from the body could not prevent the development of the exhaustion phase after 6 months.

**Keywords:** cortisol, cumulative morphometric value, adrenal glands, urethane, selenium, stress

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

**For citation:** Timofeeva N.Yu., Merkulova L.M., Struchko G.Yu., Bubnova N.V., Kostrova O.Yu., Stomenskaya I.S., Kotelkina A.A. Morphofunctional State of the Adrenal Glands in Rats under Urethane and Selenium Administration. *Journal Biomed.* 2023;19(1):85–94. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-85-94>

Submitted 18.05.2022

Revised 13.02.2023

Published 10.03.2023

## Введение

Нарушение гормонального баланса, так же как и состояние иммунодепрессии, в большинстве случаев является обязательным фактором возникновения опухолевого процесса. Развитие злокачественной опухоли создаёт в организме состояние длительного хронического стресса, что негативно влияет на различные физиологические процессы [12]. Чрезмерная активация или резкое угнетение гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при действии агрессивных факторов может вызвать срыв адаптационно-защитных механизмов, что влечёт за собой развитие тяжёлых осложнений. Основной глюкокортикоидный гормон гипоталамо-адrenalовой системы — кортизол — выполняет функцию поддержания гомеостаза путём регуляции иммуногенеза [11]. Важным свойством кортизола является его способность влиять на состояние иммунной системы и чувствительность других гормонпродуцирующих структур к регулирующим факторам,

а также контролировать скорость клеточной пролиферации и апоптоза в различных тканях [2, 17].

Причин онкологических заболеваний множество: стресс, вредные выбросы промышленных предприятий, алкоголь, продукты горения и т. д. Одним из канцерогенов, способным приводить к развитию рака лёгких, является уретан. Он является эфиром карбаминовой кислоты, используется в производстве пестицидов и фунгицидов. Рак лёгкого является одной из самых значимых медицинских и социальных проблем во всех странах, занимает первое место в структуре заболеваемости населения злокачественными новообразованиями и остаётся главной причиной смертности от них [1, 5]. Именно поэтому поиск препаратов, препятствующих развитию рака, в частности рака лёгкого, является одной из основных задач противораковой борьбы.

Одним из микроэлементов, обладающим антиканцерогенным действием, является селен [6, 7, 9]. Данное свойство было обна-

ружено при изучении рака простаты, толстого кишечника и молочной железы [8, 9, 10]. Кроме того, селен является мощным антиоксидантом, обеспечивает нормальную работу ферментов, участвующих в метаболизме гормонов щитовидной железы, улучшает репродуктивную функцию, обладает иммуномодулирующим действием [18]. Показано снижение антиоксидантной защиты раковых клеток на фоне приёма селена [16]. В настоящее время многие люди, придерживаясь правильного образа жизни, несмотря на полноценное питание, обогащают свой рацион антиоксидантными добавками, пытаются застраховать себя от возможных недугов или в надежде избавиться от уже имеющихся болезней, принимают витамины и микроэлементы, обычно курсами по 1 мес., сезонно.

**Цель исследования** — оценить морфофункциональное состояние надпочечников при введении уретана, селена и сочетанного воздействия двух этих факторов.

### **Материалы и методы**

Работа выполнена на 81 крысе-самце Wistar в возрасте 2–8 мес. массой 200–400 г, полученных из вивария медицинского факультета ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова». На протяжении всего эксперимента животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур». В опыте использовались конвенциональные животные. Эксперименты проводили в соответствии с приказом Минздрава России № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил подлежащей

лабораторной практики». Крысы были разделены на 4 группы. Первая (n=9) — интактная. Вторая (n=24) — самцы с однократным внутрибрюшинным введением уретана в дозе 1 мг/кг массы тела крысы. Третья (n=24) — животные после приёма селена с питьевой водой в дозе 20 мкг/кг массы тела крысы в сутки в течение 1 мес. (курсовой приём селена). Четвертая (n=24) — животные после приёма селена с питьевой водой в дозе 20 мкг/кг массы тела крысы в сутки в течение 1 мес. с последующим однократным внутрибрюшинным введением уретана в той же дозировке.

Выведение животных из эксперимента проводилось через 1, 2, 3 и 6 мес. после введения канцерогена и окончания приёма селена путём цервикальной дислокации. Объектом данного исследования служили кровь и надпочечники. В качестве контроля исследовался материал интактных крыс соответствующего возраста.

С помощью классических общегистологических методов исследования нами также были изучены препараты лёгких всех групп животных.

Полный анализ функциональной активности любого эндокринного органа должен включать в себя контроль над синтезом, секрецией, транспортом и биологическим эффектом гормонов. Для оценки морфофункционального состояния надпочечников нами использовался совокупный морфометрический показатель (СМП), который позволяет устранить колебания отдельных параметров (Чумаченко П.А., 1980; Абдуллаходжаева М.С. и др., 2000). СМП рассчитывали как произведение относительной массы надпочечников и относительного уровня кортизола крови. Относительная масса надпочечников рассчитывалась по формуле: масса надпочечника крысы, делённая на массу тела крысы, умноженная на 100 г. Относительный уровень кортизола представляет собой уровень

кортизола крови в пересчёте на 100 г массы тела животного. СМП отражает количество работающих элементов железа (масса органа) и интенсивность их функционирования (уровень гормона в плазме крови). Уровень кортизола в сыворотке крови определяли на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе «ChemWell Combo» с помощью иммуноферментного анализа, набор ООО «Хема» (Россия).

Полученный цифровой материал был обработан подсчётом среднего значения выборок и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  — среднее значение,  $m$  — ошибка среднего. Статистическую достоверность определяли с применением  $t$ -критерия Стьюдента с использованием специализированной программы для статистической обработки полученных результатов G-stat (Гунин А.Г., 1994, 1996).

### Результаты исследования

При изолированном введении уретана на всех сроках исследования были отмечены изменения в гистологическом строении лёгких. Так, через 1 мес. выявлено полнокровие ткани органа, периваскулярное скопление лимфоцитарных клеток, в отдельных препаратах в альвеолах диагностировалась дисплазия эпителия I степени. С увеличением сроков исследования обнаружены более выраженные изменения в строении лёгких. Полнокровие органа сохранялось, увеличилась площадь альвеол с дисплазией эпителия I–II степени, появились единичные лимфоцитарные фолликулы. Через 3 мес. обнаруживались массивная инфильтрация лимфоцитами с очагами апоптоза, полиморфные железистые структуры с явлениями дисплазии эпителия и формированием псевдососочков. Аналогичная картина наблюдалась через 6 мес. после введения канцерогена.

При сочетанном воздействии двух факторов наблюдалось выраженное полнокровие ткани лёгких, но не было обнаружено явлений

дисплазии, железистых структур с формированием псевдососочков. Приём селена не повлиял на строение лёгких экспериментальных животных.

В ходе эксперимента обнаружено, что однократное внутрибрюшинное введение уретана приводит к уменьшению массы животных по сравнению с нормой в 1,36 раза ( $p < 0,004$ ) через 1 мес. опыта, в остальные сроки значения не отличаются от интактной группы. Масса крыс через 6 мес. после окончания приёма селена в 1,39 раза ( $p < 0,024$ ) превышает массу тела интактных крыс, но не отличается от нормы на остальных сроках исследования и при сочетанном воздействии двух факторов (табл. 1).

Наименьшая масса надпочечников выявлена в группе животных, подвергшихся воздействию канцерогена: через 1 мес. — снижена в 1,34 раза ( $p < 0,007$ ), через 2 мес. — в 1,3 раза ( $p < 0,017$ ), через 3 мес. — в 1,19 раза ( $p < 0,004$ ) и через 6 мес. — в 1,21 раза ( $p < 0,002$ ). В третьей группе показатель достоверно не отличается от интактной группы, в четвёртой группе выявлено достоверное снижение массы надпочечника в 1,11 раза ( $p < 0,026$ ) через 6 мес. (табл. 1).

При исследовании крови на кортизол (табл. 2) во второй группе выявлено повышение его уровня в 1-й мес. эксперимента в 1,57 раза ( $p < 0,03$ ), через 2 и 3 мес. наблюдается снижение показателя до уровня интактных и резкое уменьшение в 5,2 раза ( $p < 0,02$ ) через 6 мес. В третьей группе уровни кортизола достоверно не отличаются от нормы, однако практически на треть меньше нормы через 1, 2 и 3 мес. В четвёртой группе отмечается достоверное снижение уровня гормона через 1 мес. в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с изолированным введением уретана и резкое уменьшение через 6 мес. — в 2,8 раза ( $p < 0,023$ ).

При изучении СМП (табл. 3) выявлено, что при воздействии канцерогена показатель максимально увеличивается в 1,63 раза через 1 мес. ( $p < 0,04$ ), досто-

**Таблица 1.** Масса крыс и надпочечников через 1, 2, 3 и 6 мес. после различных видов воздействий  
**Table 1.** Weight of rats and adrenal glands after 1, 2, 3 and 6 months after different types of exposure

Группы крыс	Сроки исследования	Масса крысы, г	Масса надпочечников, мг
Интактные	1 мес.	268,3±8,3	15,56±1,07
	2 мес.	245,8±14,56	15,69±0,25
	3 мес.	306,5±7,5	15,42±0,83
	6 мес.	289,5±17,5	18,77±0,7 <sup>**</sup> (p<0,028)
Селен	1 мес.	269,16±21,37	13,9±0,97
	2 мес.	267±17,97	15,07±0,78
	3 мес.	249,8±13,73	13,58±0,73
	6 мес.	402,5±2,5 <sup>*</sup> (p<0,024)	18,32±1,26 <sup>**</sup> (p<0,012)
Канцероген	1 мес.	196,71±11,2 <sup>*</sup> (p<0,004)	11,62±0,81 <sup>*</sup> (p<0,007)
	2 мес.	224,88±10,87	12,07±0,28 <sup>*</sup> (p<0,017)
	3 мес.	247,33±15,47	13,01±0,29 <sup>*</sup> (p<0,004)
	6 мес.	302,2±21,39	15,5±0,46 <sup>*</sup> (p<0,002)
Сочетанное воздействие селена и канцерогена	1 мес.	271,2±11,23	14,29±0,62
	2 мес.	245,87±12,07	13,93±0,31
	3 мес.	281,77±11,64	16,15±0,75 <sup>**</sup> (p<0,004)
	6 мес.	312,83±16,53	16,88±0,37 <sup>**</sup> (p<0,026)

**Примечание:** \* — значимость отличий относительно интактных животных; \*\* — значимость отличий относительно предыдущего срока исследования.

**Note:** \* — significance of differences relative to intact animals; \*\* — significance of differences relative to the previous timing of the study.

**Таблица 2.** Содержание кортизола в крови крыс через 1, 2, 3 и 6 мес. после различных видов воздействий  
**Table 2.** Cortisol level in the blood of rats at 1, 2, 3 and 6 months after completion of different types of exposure

Группы крыс	Сроки исследования	Уровень кортизола, нмоль/л
Интактные крысы	1 мес.	66,64±15,05
	2 мес.	66,10±10,1
	3 мес.	69,38±14,37
	6 мес.	70,79±12,19
Введение уретана	1 мес.	104,53±18,8 <sup>*</sup> (p<0,03)
	2 мес.	66,3±12
	3 мес.	54,24±9,6
	6 мес.	13,6±1,45 <sup>*</sup> (p<0,02)
Введение селена	1 мес.	44,92±7,67
	2 мес.	53,45±6,15
	3 мес.	42,25±8,57
	6 мес.	53,09±7,25
Сочетанное воздействие двух факторов	1 мес.	54,84±8,4 <sup>**</sup> (p<0,05)
	2 мес.	52,56±17,74
	3 мес.	62,35±14,65
	6 мес.	25,28±3,8 <sup>*</sup> (p<0,023)

**Примечание:** \* — значимость отличий относительно интактных животных; \*\* — значимость отличий относительно изолированного введения канцерогена через 1 мес.

**Note:** \* — significance of differences relative to intact animals; \*\* — significance of differences relative to isolated carcinogen administration after 1 month.

**Таблица 3.** СМП через 1, 2, 3 и 6 мес. после различных видов воздействий  
**Table 3.** Cumulative morphometric value at 1, 2, 3 and 6 months after completion of different types of exposure

Группы крыс	Сроки исследования	СМП
Интактные крысы	1 мес.	186,88±24,65
	2 мес.	201,12±24,2
	3 мес.	105,23±39,1*** (p<0,04)
	6 мес.	171,75±10,95
Введение уретана	1 мес.	305,03±35,65* (p<0,04)
	2 мес.	166,3±27,3*** (p<0,023)
	3 мес.	120,38±20,88
	6 мес.	26,42±3,5* (p<0,0002)
Введение селена	1 мес.	98,55±17* (p<0,011)
	2 мес.	137,49±18,04* (p<0,009)
	3 мес.	110,47±21,44
	6 мес.	110,67±33,14* (p<0,0048)
Сочетанное воздействие двух факторов	1 мес.	105,4±10,35** (p<0,02)
	2 мес.	160,63±25,7
	3 мес.	143,9±26,26
	6 мес.	49,21±4,92* (p<0,0003)

**Примечание:**\* — значимость отличий относительно интактных животных; \*\* — значимость отличий относительно изолированного введения канцерогена через 1 мес.; \*\*\* — значимость отличий относительно предыдущего срока исследования.

**Note:**\* — significance of differences relative to intact animals; \*\* — significance of differences relative to isolated carcinogen administration after 1 month; \*\*\* — significance of differences relative to the previous timing of the study

верно не отличается от уровня интактных крыс через 2 и 3 мес. и резко снижается через 6 мес. в 6,5 раза (p<0,0002). Введение селена привело к достоверному снижению СМП практически на всех сроках исследования. При совместном введении канцерогена и селена через 1, 2 и 3 мес. показатель не отличается от уровня интактных, однако через 1 мес. результат достоверно меньше показателя при изолированном введении уретана на том же сроке — в 2,89 раза (p<0,02). Через 6 мес. наблюдается резкое уменьшение показателя в 3,49 раза (p<0,0003). Колебания СМП (p<0,04) у интактных животных связаны с изменениями массы животных и надпочечников и уровнем кортизола в крови.

### Обсуждение результатов

Развивающийся злокачественный процесс является для организма хроническим

стресс-фактором, в сферу модифицирующего влияния которого вовлекаются различные органы и системы, в т. ч. и непосредственно участвующие в реакции организма на стресс. Одним из первых органов, реагирующим на стресс, являются надпочечники [3]. Общий ответ на внешние раздражения стереотипен и включает в себя три стадии по Г. Селье: стадия тревоги, стадия резистентности, стадия истощения, перетекающих из одной в другую. Первая — стадия тревоги, при которой стрессор через влияние на гипоталамо-гипофизарную систему вызывает высвобождение глюкокортикоидов (кортизола) из надпочечников в кровь. Реакция тревоги означает немедленную мобилизацию защитных сил организма. Во вторую стадию происходит повышение общей сопротивляемости стрессору. Организм пытается противодействовать изменениям, которые произошли во время

стадии тревоги. Количество вырабатываемого кортизола при этом уменьшается [4]. Если стрессор прекратил своё действие и организм справился с последствиями, то развитие стресса на данной стадии заканчивается, организм возвращается в исходное состояние. Третья стадия — истощения, наблюдается при продолжающемся негативном воздействии стресс-фактора. Организм начинает терять способность бороться со стрессором и уменьшать его вредное воздействие, поскольку надпочечники исчерпали свои функциональные возможности. Определяется низкий уровень кортизола. Продолжение действия экстремального фактора на данной стадии вызывает гибель животного [4].

Введение канцерогена, по данным наших исследований, приводит к гипотрофии надпочечников на всех сроках. Динамика изменений уровня глюкокортикоидов в крови животных и СМП отражает развитие фазы тревоги общего адаптационного синдрома по Г. Селье. Через 1 мес. после введения уретана развивается стадия тревоги, которая характеризуется активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси с увеличением выброса кортизола в кровь. Повышается СМП, который также указывает на значительное повышение функциональной активности надпочечников. Через 2 мес. у животных с введением уретана уровень кортизола в крови и СМП доходят до показателей интактных крыс. Проводя корреляцию изменений уровня кортизола в крови крыс и СМП с изменениями в лёгких, можно предположить развитие фазы резистентности в организме крыс. По данным литературы [14, 15], введение уретана приводит к появлению опухолей лёгких, видимых макроскопически, через 6 мес. Можно предположить, что именно к этому сроку развивается фаза истощения, т. к. канцероген никуда из организма не исчезает, и его действие сохраняется. В нашем эксперименте именно

на этом сроке выявлено резкое падение концентрации гормона в крови и уменьшение СМП, что характерно для развития фазы истощения. Гистологическое исследование лёгких подтверждает развитие патологического процесса ткани и коррелирует с изменениями кортизола, СМП и фазами адаптационного синдрома.

После прекращения курсового введения селена выявлено повышение массы животных и надпочечников через 6 мес., что связывается с улучшением метаболических процессов в организме и действием микроэлемента как анаболика. Уровень кортизола в крови экспериментальных животных достоверно не отличается от показателя интактных, однако СМП, который является более чувствительным для определения активности функционирования желёз, указывает на её снижение. Вероятно, это связано с положительным антистрессорным воздействием селена на работу надпочечников.

Это положительное воздействие установлено и при сочетанном воздействии двух факторов. Через 1, 2 и 3 мес. нами не выявлено отличий показателей кортизола и СМП от уровня интактных животных. Но через 6 мес. определяется резкий спад показателей, уменьшается и масса надпочечников. Если провести аналогию с фазами стресса по Г. Селье, то в данном случае отсутствует фаза тревоги. Сохраняющийся уровень кортизола не исключает фазу резистентности, а резкое уменьшение его указывает на фазу истощения. Вероятнее всего, в первые 3 мес. в организме крысы работал селен, введённый до уретана. Именно он защищал организм от действия канцерогена. Однако через 3 мес. уровень селена в организме иссяк, вследствие чего его защитный эффект начал ослабевать (период полувыведения составляет около 50–60 сут.) [13]. Поэтому надпочечники через 6 мес. среагировали на этот процесс: и масса органа, и уровень кортизола в крови, и СМП уменьшились. Гистологическое

исследование тканей лёгкого при сочетанном воздействии опережающего введения селена и последующего уретана доказывают положительное воздействие селена на организм. Есть перспективность в превентивном использовании селена в профилактике злокачественных заболеваний лёгких. Однако, несмотря на это, курсовое введение селена не смогло противодействовать развитию стадии истощения, а значит, не предотвратило развитие онкопроцесса. Возможно, всё зависит от длительности приёма селена, и целесообразнее принимать его на постоянной основе, однако это требует дальнейших исследований.

### Заключение

Таким образом, в результате эксперимента мы выяснили, что введение канцерогена, приём селена и сочетанное

воздействие двух указанных факторов влияют на морфофункциональное состояние надпочечников. Так, введение канцерогена в организм имитирует фазы стресса по Г. Селье: тревоги, резистентности и истощения. Фаза тревоги сопровождается повышением уровня кортизола в крови и СМП, фаза резистентности — отсутствием отличий от интактных животных, истощения — резким снижением данных показателей. Кроме этого, нами выявлено положительное «антитревожное» влияние селена на адренокортикоидную систему и на весь организм в целом, которое сохраняется длительно даже после прекращения курсового приёма микроэлемента. Однако данные нашего исследования показывают, что такой кратковременный приём селена не противодействует развитию онкопроцесса при введении уретана.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Гусев К.В., Кузнецов В.В., Толкачева Е.В. Опыт применения низкодозовой компьютерной томографии для раннего выявления рака лёгкого у населения Тюменской области. *Академический журнал Западной Сибири*. 2018;5(76):26–27. [Gusev K.V., Kuznetsov V.V., Tolkacheva E.V. Opyt primeneniya nizkodozovoi komp'yuternoj tomografii dlya rannego vyavleniya raka legkogo u naseleniya Tyumenskoj oblasti [Experience of low-dose computed tomography for early detection of lung cancer in the Tyumen region population]. *Akademicheskii zhurnal Zapadnoi Sibiri [Academic Journal of West Siberia]*. 2018;5(76):26–27. (In Russian)].
2. Козлова М.Б., Франциянц Е.М., Трепитки Л.К., Каплиева И.В., Сергостьянц Г.З., Айрапетова Т.Г., Погорелова Ю.А. Состояние системного гормонального гомеостаза у крыс с трансплантированными в лёгкое клетками саркомы С-45. *Фундаментальные исследования*. 2015;1–8:1605–1610. [Kozlova M.B., Frantsiyants E.M., Trepitaki L.K., Kaplieva I.V., Sergost'yants G.Z., Airapetova T.G., Pogorelova Yu.A. Sostoyanie sistemnogo gormonal'nogo gomeostaza u kryс s transplantirovannymi v legкое kletkami sarkomy S-45 [State of hormonal homeostasis system in rats with S45 sarcoma cells transplanted to lungs]. *Fundamental'nye issledovaniya [Fundamental research]*. 2015;1–8:1605–1610. (In Russian)].
3. Кострова О.Ю., Котёлкина А.А., Меркулова Л.М., Стоменская И.С., Стручко Г.Ю., Тимофеева Н.Ю., Бубнова Н.В. Изменение содержания биогенных аминов и их соотношения в надпочечниках и тимусе при водноиммобилизационном стрессе. *Acta Medica Eurasica*. 2019;3:53–60. [Kostrova O.Yu., Kotelkina A.A., Merkulova L.M., Stomenskaya I.S., Struchko G.Yu., Timofeeva N.Yu., Bubnova N.V. Izmenenie soderzhaniya biogennykh aminov i ikh sootnosheniya v nadpochechnikakh i timuse pri vodnoimmobilizatsionnom strese [Changes in the content of biogenic amines and their ratio in adrenal glands and the thymus under water-immobilization stress]. *Acta Medica Eurasica*. 2019;3:53–60. (In Russian)].
4. Кухаренко Н.С., Новоселова А.А. Коррекция хронического холодового стресса у крыс пробиотическим препаратом. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*. 2009;7(34):110–112. [Kukhareno N.S., Novoselova A.A. Korrektsiya khronicheskogo kholodovogo streсса u kryс probioticheskim preparatom [Chronic cold stress correction in rats by means of the probiotic preparation]. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta [The Bulletin of KrasGAU]*. 2009;7(34):110–112. (In Russian)].
5. Ральченко Е.С., Книга М.Ю. Некоторые показатели онкологической заболеваемости на юге Тюменской области. *Научный форум. Сибирь*. 2015;1(2):55–56. [Ral'chenko E.S., Kniga M.Yu. Nekotorye pokazateli onkologicheskoi zabolevaemosti na yuge Tyumenskoj oblasti [Some indices of cancer morbidity in the south

- of the Tyumen region]. *Nauchnyi forum. Sibir' [Scientific forum. Siberia]*. 2015;1(2):55–56. (In Russian)].
6. Abdalla M.A., Sulieman S., Mühlhng K.H. Regulation of selenium/sulfur interactions to enhance chemopreventive effects: Lessons to learn from Brassicaceae. *Molecules*. 2020;25(24):5846. DOI: 10.3390/molecules25245846.
  7. Bera S., De Rosa V., Rachidi W., Diamond A.M. Does a role for selenium in DNA damage repair explain apparent controversies in its use in chemoprevention? *Mutagenesis*. 2013;28(2):127–134. DOI: 10.1093/mutage/ges064.
  8. Canter J.A., Ernst S.E., Peters K.M., Carlson B.A., Thielman N.R.J., Grysczyk L., Udofe P., Yu Y., Cao L., Davis C.D., Gladyshev V.N., Hatfield D.L., Tsuji P.A. Selenium and the 15kDa selenoprotein impact colorectal tumorigenesis by modulating intestinal barrier integrity. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(19):10651. DOI: 10.3390/ijms221910651.
  9. Fontelles C.C., Ong T.P. Selenium and breast cancer risk: Focus on cellular and molecular mechanisms. *Adv. Cancer Res.* 2017;136:173–192. DOI: 10.1016/bs.acr.2017.08.001.
  10. Ganash M.A. Anticancer potential of ascorbic acid and inorganic selenium on human breast cancer cell line MCF-7 and colon carcinoma HCT-116. *J. Cancer Res. Ther.* 2021;17(1):122–129. DOI: 10.4103/jcrt.JCRT\_989\_17.
  11. Giudice A., Aliberti S.M., Barbieri A., Pentangelo P., Bisogno I., D'Arena G., Cianciola E., Caraglia M., Capunzo M. Potential mechanisms by which glucocorticoids induce breast carcinogenesis through Nrf2 inhibition. *Front. Biosci.* (Landmark Ed). 2022;27(7):223. DOI: 10.31083/j.fbl2707223.
  12. Lugović L., Situm M., Vurnek M., Buljan M. Djelovanje psiho-neuroimunoloskih i endokrinoloskih cimbenika u bolesnika s malignim bolestima kože [Influence of psychoneuroimmunologic factors on patients with malignant skin diseases]. *Acta Med. Croatica*. 2007;61(4):383–389.
  13. Minich W.B. Selenium metabolism and biosynthesis of selenoproteins in the human body. *Biochemistry (Mosc.)*. 2022;87(Suppl. 1):S168–S177. DOI: 10.1134/S0006297922140139.
  14. Parashar P., Rathor M., Dwivedi M., Saraf S.A. Hyaluronic acid decorated naringenin nanoparticles: appraisal of chemopreventive and curative potential for lung cancer. *Pharmaceutics*. 2018;10(1):33. DOI: 10.3390/pharmaceutics10010033.
  15. Radwan E., Ali M., Faied S.M.A., Omar H.M., Mohamed W.S., Abd-Elghaffar S.K., Sayed A.A. Novel therapeutic regimens for urethane-induced early lung cancer in rats: Combined cisplatin nanoparticles with vitamin-D3. *IUBMB Life*. 2021;73(2):362–374. DOI: 10.1002/iub.2432.
  16. Sharapov M.G., Novoselov V.I. Catalytic and signaling role of peroxiredoxins in carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc.)*. 2019;84(2):79–100. DOI: 10.1134/S0006297919020019.
  17. Xu M.-J., Fang G.-E., Zin Y.-S., Song L.-N. Effect of glucocorticoid on proliferation, differentiation, and glucocorticoid receptor expression in human ovarian carcinoma cell line 3AO. *Acta Pharmacol. Sci.* 2002;23(9):818–823.
  18. Zeng H., Combs G.F. Jr. Selenium as an anticancer nutrient: Roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J. Nutr. Biochem.* 2008;19(1):1–7. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2007.02.005.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Тимофеева Наталья Юрьевна\***, ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»;

**e-mail: bla11blabla@yandex.ru**

**Меркулова Лариса Михайловна**, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»;

**e-mail: merkulova192@mail.ru**

**Стручко Глеб Юрьевич**, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»;

**e-mail: glebstr@mail.ru**

**Бубнова Наталья Владимировна**, ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»;

**e-mail: natalia210485@yandex.ru**

**Natalia Yu. Timofeeva\***, I.N. Ulyanov Chuvash State University;

**e-mail: bla11blabla@yandex.ru**

**Larisa M. Merkulova**, Dr. Sci. (Med.), Prof., I.N. Ulyanov Chuvash State University;

**e-mail: merkulova192@mail.ru**

**Gleb Yu. Struchko**, Dr. Sci. (Med.), Prof., I.N. Ulyanov Chuvash State University;

**e-mail: glebstr@mail.ru**

**Natalia V. Bubnova**, I.N. Ulyanov Chuvash State University;

**e-mail: natalia210485@yandex.ru**

**Кострова Ольга Юрьевна**, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»;  
[e-mail: evkbiz@yandex.ru](mailto:evkbiz@yandex.ru)

**Стоменская Ирина Станиславовна**, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»;  
[e-mail: irina.stomenskaja@gmail.com](mailto:irina.stomenskaja@gmail.com)

**Котёлкина Анастасия Андреевна**, к.м.н., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»;  
[e-mail: ds6426@chebnet.com](mailto:ds6426@chebnet.com)

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

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

**Anastasiia A. Kotelkina**, Cand. Sci. (Med.), I.N. Ulyanov Chuvash State University;  
[e-mail: ds6426@chebnet.com](mailto:ds6426@chebnet.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](http://www.laboratorkorm.ru)

# НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ФГБУН НЦБМТ ФМБА России

В научно-производственной лаборатории (главный технолог – Шарабанов Андрей Вячеславович) разрабатываются новые эффективные методы выделения биологически активных веществ из сырья растительного и животного происхождения, с применением инновационного высокотехнологичного оборудования для экстракции, ультрафильтрации, сушки.

Основные направления работы:

- оптимизация процессов экстрагирования, ультрафильтрации и лиофильной сушки;
- интенсификация воздействия на клеточные структуры;
- увеличение и активизация диффузионных (массообменных) процессов.

Концентрирование (диафильтрация) полученных экстрактов до достижения плотности раствора 1,02–1,03 г/см<sup>3</sup>, позволяющее удалять низкомолекулярные вещества, производится с помощью мембранной установки для нанофильтрации в тангенциальном режиме на фильтрующем элементе с пределом отсечения 300–500 Да.

Коллективом лаборатории разработана технология электроимпульсной плазменной экстракции сырья биологического происхождения со степенью экстрактивности более 20%, что в несколько раз выше по сравнению с традиционными способами (мацерация, обработка ультразвуком, перколяция и т.д.). Главными преимуществами метода являются повышение степени извлечения активных компонентов от исходного содержания до 90–95%, сокращение времени обработки сырья с 12–36 часов до 10–15 минут, обеззараживание экстракта в процессе обработки смеси высоковольтными импульсами, исключение агрессивных и токсичных экстрагентов за счёт большей эффективности экстрагирования водой и обеспечение экологической чистоты процесса.

