

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2713-0428 (online)

# БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 19

2023

# 3E



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий  
ФМБА России»

# БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.  
4 выпуска в год

---

2023, Том 19, № 3E

---

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. 3E

---

# 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, академ. 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., академ. РАН (Москва, Россия)

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

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

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

**Влахов Витан**, д.м.н., проф., академ. 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., академ. РАН (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Хритинин Дмитрий Фёдорович**, д.м.н., проф., академ. 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., академ. 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>	2713-0428 (Print) 2713-0428
<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 «МедиаКолор» 127273, Российская Федерация, Москва, Сигнальный проезд, 19
<b>Дата выхода в свет:</b>	06.11.2023

# 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. Safronov**, 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>	2713-0428 (Print) 2713-0428
<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>	MediaColor LLC 127273, Russian Federation, Moscow, Signalny proezd, 19
<b>Publication date:</b>	06.11.2023

## ■ ГЕНЕТИКА И ЭПИГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ-БИОМОДЕЛЕЙ

- Н.Н. Каркищенко, Е.С. Глотова, Н.В. Петрова, В.В. Слободенюк, Н.А. Ларюшина, Д.В. Петров, И.А. Васильева, К.Е. Дерябин**  
Генетический скрининг новой трансгенной гуманизированной по *HLA-A\*02:01:01:01* и *hβ2m* линии мышей ..... 10

## ■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- А.Е. Бурова, А.П. Рейх, А.В. Горлова, Е.П. Свирич, К.Н. Забегалов, К.Д. Чапров, А.Е. Умрюхин, Т.В. Стрекалова**  
Пищевая добавка на основе витамина В<sub>9</sub> нормализует экспрессию генов — регуляторов липидного обмена в мышинной модели диеты с высоким содержанием холестерина. .25
- А.А. Дельцов, С.В. Полябин**  
Сравнительный анализ стресспротекторного действия солей лития в тесте «Открытое поле» . . . .31
- О.Б. Жукова, Е.М. Колоскова**  
Реакция яичников мышей на стимуляцию препаратом ФСГ-СУПЕР . . . . . 36
- Т.А. Кудряшов, М.В. Трунилина, В.В. Быков, И.С. Болдаевский, А.С. Соколов, Ю.С. Лаптева**  
Разработка алгоритма идентификации N-концевых ацетилтрансфераз бактерий и верификация их функциональной активности . . . . . 43
- Ю.С. Лаптева, В.В. Быков, М.В. Трунилина, И.С. Болдаевский, Т.А. Кудряшов, А.А. Вологжаникова, А.С. Соколов**  
Получение сверхстабильной метионинаминопептидазы для удаления метионина из рекомбинантных белков . . . . . 47
- С.А. Мачулин, Т.А. Астрелина, Д.Ю. Усупжанова, А.О. Завьялов, Т.Ф. Маливанова, А.И. Головкова, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова, В.А. Брунчуков, А.А. Расторгуева, В.А. Никитина, Е.Е. Ломоносова, О.Г. Михадаркина, А.С. Самойлов**  
Создание методом 3D-печати тканеинженерной конструкции, предназначенной для замещения дефектов хрящевой ткани . . . . . 52
- О.И. Степанова, Р.А. Клёсов, Х.Х. Семёнов, И.А. Помыткин, В.Н. Каркищенко**  
Изучение эффективности воздействия инфракрасного излучения на регуляцию окислительного метаболизма в тканях организма мышей линии C57BL/KsJYLepr<sup>db/+</sup> . . . . . 59
- Н.С. Стрельникова, О.М. Розанова, Е.Н. Смирнова, Т.А. Белякова, А.В. Смирнов**  
Изучение эффективности высоких доз протонов на индукцию солидных опухолей у мышей при облучении асцитных клеток карциномы Эрлиха *ex vivo* . . . . . 66
- Н.С. Тропская, Е.А. Кислякова, И.Г. Вилкова, Ю.В. Гурман, О.С. Кислицына, Е.Н. Бородина, Т.В. Черненькая, Т.С. Попова**  
Экспериментальное исследование эффективности фармаконутриентного энтерального питания и инулина в коррекции моторных расстройств кишечника и микробиоценоза в послеоперационном периоде в условиях эндотоксемии . . . . . 71
- М.П. Шевелёва, Е.Л. Немашкалова, Е.И. Дерюшева**  
Изучение влияния гепарина на взаимодействие антиген-антитело в модельной системе терапевтического антитела бевацизумаб и его мишени VEGF-A165 . . . . . 77

## ■ РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

- А.А. Бондаренко, А.С. Мелехова, А.Я. Беспалов, Т.Л. Горчакова, Л.И. Прокопенко**  
Использование *Daphnia magna Straus* в качестве тест-объекта для скрининга холинергических фармакологических веществ ..... 81

## ■ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

- О.В. Буюклинская, С.М. Напалкова, Е.Д. Кубасова, Д.С. Макарова**  
Влияние наноформы 9-фенил-2,3,4,5,6,7,8,9-октагидро-1Н-селеноксантина на репродуктивную функцию белых крыс ..... 85

- С.А. Зозуля, О.Ю. Соколов, Н.В. Кост, Н.В. Баймеева, А.К. Дадаян, Ю.А. Золотарев**  
Пептид HLDF-6-N проявляет противовоспалительное действие при развитии депрессии на МФТП модели болезни Паркинсона ..... 90

- Д.Ю. Ивкин, А.А. Карпов, В.Е. Ковансков, И.А. Титович**  
Экспериментальная оценка фармакологической безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием ..... 95

- А.С. Ивкина, Д.Ю. Ивкин, Е.Б. Шустов, М.Н. Пovyдыш**  
Оценка влияния экстрактов диоскореи на переносимость физической нагрузки при одновременном воздействии гипоксического и температурного факторов ..... 99

- П.А. Каралкин, К.Г. Кудрин, Д.С. Святославов, Д.А. Усатов, И.В. Решетов**  
Разработка и доклинические испытания персонализированных пористых титановых имплантатов с биоактивными покрытиями в модельных системах ..... 104

- А.Е. Ким, Е.Б. Шустов**  
Особенности фармакокинетики нового производного диметиламиноэтанола при пероральном пути введения лабораторным животным ..... 110

- Е.А. Литус, Е.Л. Немашкалова, А.А. Вологжанникова, Е.И. Дерюшева**  
Влияние L-тироксина, природного лиганда человеческого сывороточного альбумина, на кинетику фибриллообразования  $\beta$ -амилоидного пептида ..... 114

- А.Н. Овчарова, Н.В. Белова**  
Влияние *L. reuteri* на неспецифическую резистентность и гематологические показатели лабораторных животных ..... 119

- К.М. Щепеткова, Е.Г. Батоцыренова, Е.Б. Шустов, В.А. Кашуро, А.В. Шарабанов, Н.П. Раменская**  
Влияние этомерзола фумарата на когнитивные функции крыс при отравлении ацетатом ртути ..... 124

## ■ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

- О.М. Куделина, Е.В. Ганцгорн, Ю.С. Макляков, Д.Л. Ткаченко, Л.А. Авакян, П.А. Чубырева, У.Г. Амирова, Ю.А. Карпова, А.Н. Дульская, И.Б. Месхи**  
Особенности клинического течения и способы терапии аквагенной крапивницы ..... 130



■ GENETICS AND EPIGENETICS OF ANIMAL BIOMODELS

**Nikolay N. Karkischenko, Elena S. Glotova, Nataliya V. Petrova, Vladimir V. Slobodenyuk, Nadezhda A. Laryushina, Dmitry V. Petrov, Irina A. Vasil'eva, Kirill E. Deryabin**  
 Genetic Screening of a New Transgenic Mouse Line Humanized for *HLA-A\*02:01:01:01* and *hβ2m*. . . . 10

■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

**Alisa E. Burova, Aleksandra P. Reykh, Anna V. Gorlova, Evgeniy P. Svirin, Konstantin N. Zabegalov, Kirill D. Chaprov, Aleksei E. Umrukhin, Tatiana V. Strekalova**  
 A Vitamin B<sub>9</sub>-based Dietary Supplement Normalizes the Expression of Lipid Metabolism Regulatory Genes in a Mouse Model of a High-cholesterol Diet . . . . . 25

**Alexandr A. Deltsov, Sergey V. Pozyabin**  
 Comparative Analysis of the Stress Protective Effect of Lithium Salts in an Open Field Test . . . . . 31

**Olga B. Zhukova, Elena M. Koloskova**  
 Response of Mouse Ovaries to Stimulation with the FSH-SUPER Drug . . . . . 36

**Timofey A. Kudryashov, Maria V. Trunilina, Vyacheslav V. Bykov, Igor S. Boldaevsky, Andrey S. Sokolov, Yulia S. Lapteva**  
 Development of an Algorithm for Identification of N-terminal Acetyltransferases and Verification of Their Functional Activity . . . . . 43

**Yulia S. Lapteva, Vyacheslav V. Bykov, Maria V. Trunilina, Igor S. Boldaevsky, Timofey A. Kudryashov, Alisa A. Vologzhannikova, Andrey S. Sokolov**  
 Obtaining Overstable Methionine Aminopeptidase for the Removal of Methionine From Recombinant Proteins . . . . . 47

**Semen A. Machulin, Tatiana A. Astrelina, Daria Yu. Usupzhanova, Anton O. Zavialov, Tatiana F. Malivanova, Anastasia I. Golovkova, Irina V. Kobzeva, Yulia B. Suchkova, Vitaliy A. Brunchukov, Anna A. Rastorgueva, Viktoria A. Nikitina, Elena E. Lomonosova, Olga G. Mihadarkina, Alexandr S. Samoilo**  
 3D Printing of a Tissue-Engineered Structure Intended to Replace Cartilage Defects . . . . . 52

**Olga I. Stepanova, Roman A. Klesov, Khyzyr Kh. Semenov, Igor A. Pomytkin, Vladislav N. Karkischenko**  
 Effect of Infrared Radiation on the Regulation of Oxidative Metabolism in C57BL/KsJYLepr<sup>db/+</sup> Mice . . . . . 59

**Nataliia S. Strelnikova, Olga M. Rozanova, Helena N. Smirnova, Tatiana A. Belyakova, Alexandr V. Smirnov**  
 Efficacy of High Doses of Protons on the Induction of Solid Tumors in Mice by *Ex vivo* Irradiation of Ehrlich Ascitic Carcinoma Cells . . . . . 66

**Nataliya S. Tropskaya, Ekaterina A. Kislyakova, Irina G. Vilkova, Yulia V. Gurman, Oksana S. Kislitsyna, Yevgeniya N. Borodina, Tatyana V. Chernen'kaya, Tamara S. Popova**  
 Experimental Study of the Efficacy of Pharmaconutrient Enteral Nutrition and Inulin in the Correction of Intestinal Motor Disorders and Microbiocenosis in the Postoperative Period Under Endotoxemia Conditions . . . . . 71

**Marina P. Shevelyova, Ekaterina L. Nemashkalova, Evgeniya I. Deryusheva**  
 Effect of Heparin on Antigen-Antibody Interaction in a Model System of the Bevacizumab Therapeutic Antibody And its Target VEGF-A165 . . . . . 77

## ■ RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELLING

- Anastasiya A. Bondarenko, Aleksandra S. Melehova, Aleksandr Ya. Bespalov, Tat'jana L. Gorchakova, Ljubov' I. Prokopenko**  
*Daphnia magna* Straus as a Test Object for Screening Cholinergic Pharmacological Substances . . . . . 81

## ■ PRECLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE

- Olga V. Buyuklinskaya, Svetlana M. Napalkova, Elena D. Kubasova, Daria S. Makarova**  
 Influence of a Nanoform of 9-phenyl-2,3,4,5,6,7,8,9-octahydro-1H-selenoxanthene on the Reproductive Function of White Rats . . . . . 85
- Svetlana A. Zozulya, Oleg Yu. Sokolov, Natalia V. Kost, Natalia V. Baimeeva, Alexandr K. Dadayan, Yuriy A. Zolotarev**  
 HLDF-6-H Peptide Exhibits an Anti-inflammatory Effect in the Development of Depression in an MPTP Model of Parkinson's Disease . . . . . 90
- Dmitry Yu. Ivkin, Andrew A. Karpov, Vladislav E. Kovanskov, Irina A. Titovich**  
 Experimental Evaluation of the Pharmacological Safety of a New Propagandic Acid Derivative with a Cardiotropic Action . . . . . 95
- Arina S. Ivkina, Dmitry Yu. Ivkin, Evgeny B. Shustov, Maria N. Povydysh**  
 Influence of Dioscorea Extracts on Physical Load Tolerance in the Setting of Hypoxic and Temperature Factors . . . . . 99
- Pavel A. Karalkin, Konstantin G. Kudrin, Dmitry S. Svyatoslavov, Dmitry A. Usatov, Igor V. Reshetov**  
 Development and Preclinical Trials of Customized Porous Titanium Implants with Bioactive Coatings in Model Systems . . . . . 104
- Aleksey E. Kim, Evgeny B. Shustov**  
 Pharmacokinetics of a New Dimethylamineethanol Derivative Administered Orally to Laboratory Animals . . . . . 110
- Ekaterina A. Litus, Ekaterina L. Nemashkalova, Alisa A. Vologzhannikova, Evgeniya I. Deryusheva**  
 Effect of L-thyroxine, a Human Serum Albumin Natural Ligand, on the Kinetics of  $\beta$ -amyloid Peptide Fibril Formation . . . . . 114
- Anastasia N. Ovcharova, Nadezhda V. Belova**  
 The effect of *L. reuteri* on Nonspecific Resistance and Hematological Parameters of Laboratory Animals . . . . . 119
- Kristina M. Shchepetkova, Ekaterina G. Batotsyrenova, Evgeny B. Shustov, Vadim A. Kashuro, Andrey V. Sharabanov, Natalya P. Ramenskaya**  
 Influence of Etomersol Fumarate on Cognitive Functions of Rats During Mercury Acetate Poisoning . . . . . 124

## ■ BIOMEDICAL TECHNOLOGIES IN CLINICAL RESEARCH

- Oksana M. Kudelina, Elena V. Gantsgorn, Yuri S. Maklyakov, Darya L. Tkachenko, Lilia A. Avakyan, Polina A. Chubyreva, Yliana G. Amirova, Yulia A. Karpova, Alina N. Dulskaya, Irakly B. Meshi**  
 Clinical Course and Therapy Methods of Aquagenic Urticaria . . . . . 130



## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ НОВОЙ ТРАНСГЕННОЙ ГУМАНИЗИРОВАННОЙ ПО *HLA-A\*02:01:01:01* И *hβ2m* ЛИНИИ МЫШЕЙ

Н.Н. Каркищенко, Е.С. Глотова\*, Н.В. Петрова, В.В. Слободенюк, Н.А. Ларюшина,  
Д.В. Петров, И.А. Васильева, К.Е. Дерябин

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

Создание новой гуманизированной трансгенной линии мышей-биомоделей, несущих ген *HLA-A\*02:01:01:01*, требует разработки эффективного метода верификации наличия целевого трансгена в геноме животных. Нами была разработана система генетического скрининга животных на основе метода ПЦР в реальном времени и высокоспецифичных праймеров, позволяющих детектировать все функционально значимые части генетической конструкции. Кроме того, методом секвенирования по Сэнгеру было показано отсутствие химеризма и полное соответствие первичной нуклеотидной последовательности трансгена *HLA-A\*02:01:01:01* заявленной генно-инженерной конструкции и гену *HLA-A\*02:01:01:01* человека. По результатам селекционно-генетической работы с полученными трансгенными животными были определены три наиболее перспективные сублинии, которые используются для выведения новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A\*02:01:01:01*.

**Ключевые слова:** ПЦР в реальном времени, секвенирование по Сэнгеру, верификация трансгена, *HLA A\*02:01:01:01*, селекционно-генетическая работа

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

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

**Для цитирования:** Каркищенко Н.Н., Глотова Е.С., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Ларюшина Н.А., Петров Д.В., Васильева И.А., Дерябин К.Е. Генетический скрининг новой трансгенной гуманизированной по *HLA-A\*02:01:01:01* и *hβ2m* линии мышей. *Биомедицина*. 2023;19(3E):10–24. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-10-24>

Поступила 10.04.2023

Принята после доработки 17.07.2023

Опубликована 06.11.2023

## GENETIC SCREENING OF A NEW TRANSGENIC MOUSE LINE HUMANIZED FOR *HLA-A\*02:01:01:01* AND *hβ2m*

Nikolay N. Karkischenko, Elena S. Glotova\*, Nataliya V. Petrova,  
Vladimir V. Slobodenyuk, Nadezhda A. Laryushina, Dmitry V. Petrov, Irina A. Vasil'eva,  
Kirill E. Deryabin

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

The development of new humanized transgenic mouse biomodels with the *HLA-A\*02:01:01:01* gene requires effective methods for target transgene verification in the animal genome. In the present study, we

develop a system for genetic screening of animals based on real-time PCR and using highly specific primers to detect all functionally significant parts of the genetic construct. In addition, the Sanger sequencing method showed the absence of chimerism and complete correspondence between the primary nucleotide sequence of the *HLA A\*02:01:01:01* transgene and the developed engineered genetic construct and human gene *HLA A\*02:01:01:01*. Based on the results of selection and genetic works with the resulting transgenic animals, three most promising sublines were identified. These lines are currently used for breeding a new line of humanized transgenic mice with the *HLA-A\*02:01:01:01* gene.

**Keywords:** real-time PCR, Sanger sequencing, transgene verification, *HLA-A\*02:01:01:01*, selection and genetic work

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

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

**For citation:** Karkischenko N.N., Glotova E.S., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Laryushina N.A., Petrov D.V., Vasil'eva I.A., Deryabin K.E. Genetic Screening of a New Transgenic Mouse Line Humanized for *HLA-A\*02:01:01:01* and *hβ2m*. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):10–24. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-10-24>

Submitted 10.04.2023

Revised 17.07.2023

Published 06.11.2023

## Введение

Современные тенденции развития биомедицинских исследований диктуют новые требования по дизайну эксперимента, что преследует цель повышения качества и трансляционности получаемых результатов. Одним из ключевых моментов качественного исследования является выбор адекватной биомодели, максимально точно соответствующей задачам исследования. Однако с накоплением научных знаний исследователи сталкиваются с проблемой несоответствия существующих биомodelей актуальным данным, что осложняет дальнейшую работу и ставит под сомнение полученные результаты. Таким образом, важнейшей задачей современного биомоделирования является разработка и валидация актуальных биомodelей, отвечающих современным стандартам и критериям качества, применяемым в сфере биомедицинских исследований.

Особую роль среди биомodelей имеют гуманизированные животные. На сегодня биомodelи, несущие гены человека, широко применяются для широкого спектра

исследований в различных областях науки. Анатомическая, физиологическая, нейробиологическая и метаболическая аналогии [9, 14, 16, 22] основных животных биомodelей (мыши, крысы, мини-пиги [7, 10, 17, 23]) позволяют с высокой степенью достоверности моделировать различные патологические состояния человека, вплоть до создания биомodelей, воспроизводящих особенности конкретного человека. Совершенствование молекулярно-генетических методов редактирования генома (CRISPR/Cas9, ZFNs, TALENs) позволяет в короткие сроки получить биомodelь с заданными свойствами, отвечающую задачам исследования. Кроме того, неоспоримым преимуществом некоторых модельных животных (крысы, мыши) является возможность проследить возможные побочные эффекты в ряде поколений, что особенно важно для тестирования и контроля качества препаратов генной терапии [12].

Создание новых биомodelей тесно связано с необходимостью разработки современных методов для верификации модели и контроля качества вновь создаваемых

линий животных. Учитывая случайный механизм встраивания трансгена *HLA-A\*02:01:01:01*, его интеграция может внести изменения в транскрипционную и функциональную активность региона встраивания [15] вплоть до нарушения работы собственных генов организма [19] или активации онкогенов [13], так же как и окружающая ДНК может привести к неконтролируемой экспрессии трансгена [23]. Тщательный генетический скрининг поголовья животных позволяет не только контролировать наследуемость интересующего признака, но и проводить эффективный отбор особей по различным критериям, таким как плодовитость и репродуктивный потенциал, сила экспрессии трансгена, отсутствие побочных эффектов, наличие мутаций и генетических перестроек и пр. Контроль генетической чистоты и отбор наиболее перспективных особей и сублиний для размножения являются предметом селекционно-генетической работы с новой линией животных биомоделей.

Как было описано ранее [6], нами были получены родоначальники новой гуманизированной трансгенной линии мышей-биомоделей, несущие ген *HLA-A\*02:01:01:01*. Животные были получены методом микроинъекций линейного фрагмента (рис. 1) генно-инженерной конструкции (ГИК) в мужской пронуклеус зигот с последующим переносом потенциально модифицированных эмбрионов в репродуктивный тракт псевдобеременным самкам-реципиентам. Созданная ГИК кодирует химерную молекулу главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I на поверхности клеток, состоящую из,  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - доменов HLA человека и  $\alpha 3$ -домена комплекса H 2K мыши, стабилизированную  $\beta_2$ -микроглобулином человека, соединённым глицин сериновым линкером с  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - доменами HLA. Данная биомодель может успешно применяться для решения широкого спектра исследовательских задач, включая исследования

иммунных реакций, инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также разработки и тестирования вакцин и исследования в области фармакобезопасности и иммуногенности.

**Целью** настоящей **работы** было создание методики верификации трансгена *HLA-A\*02:01:01:01* у полученных животных новой гуманизированной трансгенной линии и подтверждение соответствия нуклеотидной последовательности трансгена заявленной ГИК и гену *HLA-A\*02:01:01:01* человека, а также селекционно-генетическая работа с животными новой линии.

## **Материалы и методы**

### **Экспериментальные животные**

Для проведения селекционно-генетической работы использовались самки и самцы новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном *HLA-A\*02:01:01:01* поколений F0–F3, полученные в ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России», а также гибридные мыши линии СВА/лс×С57Bl/6 (F1), полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России». Животные содержались в системе индивидуальных вентилируемых клеток при световом режиме 12/12 со свободным доступом к еде и воде. Для получения F1 трансгенные особи F0 скрещивались с половозрелыми животными линии СВА/лс×С57Bl/6 (F1), а для получения F2 и следующих поколений племядра формировали из подтверждённых особей предыдущего поколения по технологии инбредного скрещивания.

### **Биоматериал для генетического анализа**

Материалом для исследования присутствия трансгена *HLA-A\*02:01:01:01* у мышей служили биоптаты хвоста. Для анализа пробы брали у всех животных, достигших возраста 3 недели.

Для определения нуклеотидной последовательности трансгена и степени химе-

ризма использовали лейкоциты из цельной крови, а также биоптат внутренних органов взрослого животного — носителя гена *HLA-A\*02:01:01:01*.

### **Выделение РНК**

Получение препаратов РНК проводили с использованием набора реагентов РИБО сорб («AmpliSens», Россия) согласно инструкции производителя. Готовые растворы РНК хранили при температуре не выше +16°C не более 1 мес.

### **Обратная транскрипция**

Получение кДНК для последующего анализа методом ПЦР проводили с использованием комплекта реагентов РЕВЕРТА-Л («AmpliSens», Россия) согласно инструкции производителя. Готовый препарат кДНК хранится при температуре не выше минус 16°C в течение 1 недели или при температуре не выше минус 68°C в течение года.

### **Подбор праймеров**

Для определения нуклеотидной последовательности праймеров было использовано программное обеспечение Vector NTI («ThermoFisher Scientific») и база данных BLAST. Синтез праймеров — «ДНК синтез» (Россия).

### **ПЦР в реальном времени**

РВ-ПЦР проводили с использованием флуоресцентных зондов и специфических праймеров («ДНК синтез», Россия) на амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США).

### **Классическая ПЦР**

Реакцию проводили с использованием высокоспецифичных праймеров («ДНК синтез», Россия) на амплификаторе («ДНК Технология», Россия). Продукт ПЦР использовали для секвенирования по Сэнгеру.

### **Секвенирование по Сэнгеру**

Процедуру проводили с использованием прямых и обратных праймеров на секвенаторе Genetic Analyser 3500 («Applied Biosystems»). Обработку полученных результатов и сравнение и выравнивание последовательностей проводили с помощью программного обеспечения Vector NTI

(«ThermoFisher Scientific») и онлайн-модуля BLAST Align (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

## **Результаты и их обсуждение**

### **Дизайн системы верификации трансгена *HLA-A\*02:01:01:01* методом ПЦР в реальном времени**

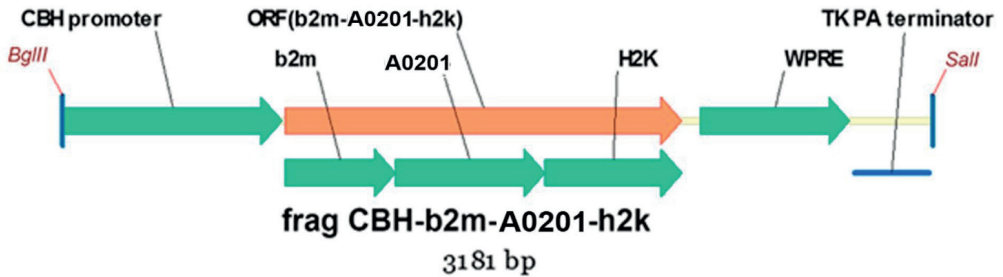
ПЦР в реальном времени — это семейство методик количественной ПЦР со следующими чертами: а) определение выхода продукта реакции после каждого цикла амплификации; б) построение по этим данным кинетической кривой PCR; в) определение относительной концентрации субстрата на основании анализа этой кривой. Для детекции ПЦР-продукта используются флуоресцентные метки, обеспечивающие флуоресценцию, прямо пропорциональную количеству ПЦР продукта — репортерную флуоресценцию. Данный метод позволяет точно и в короткий срок выявить нужную нуклеотидную последовательность в препаратах геномной ДНК или кДНК.

Для получения гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A\*02:01:01:01* и презентирующих гибридные молекулы HLA класса I на поверхности клеток, была использована генно-инженерная конструкция СВН b2m A0201 h2k (структурные элементы представлены в табл. 1), линейаризованный фрагмент (рис. 1) которой был внесён в мужской пронуклеус зигот мышей-доноров C57Bl/6Y×CBA/лас. Гибридная молекула MHC класса I представляет собой белок, содержащий β<sub>2</sub>-микроглобулин человека, слитый с α1- и α2-доменами *HLA-A\*02:01:01:01*, и α3-домен H 2K мыши (трансмембранная и цитоплазматическая части).

Нами осуществлен биоинформационный анализ последовательностей целевых участков ГИК с помощью базы NCBI, специфичных для отбора наиболее перспективных нуклеотидных последовательностей для использования в синтезе

**Таблица 1.** Структура генной конструкции CBH-b2m-A0201-h2k  
**Table 1.** Structure of gene construct CBH-b2m-A0201-h2k

Фрагмент	Описание	Размер, п.н.
CBH	промотор	796
$\beta_2m$ человека	кДНК $\beta_2$ -микроглобулина человека	402
Линкер (Гли4 Сер1) x3	линкер	45
Фрагмент HLA-A0201	фрагмент кДНК МНС I HLA-A*02:01:01:01 класса человека (домены $\alpha 1$ , $\alpha 2$ )	540
Фрагмент h2k	фрагмент кДНК МНС I класса мыши: домен $\alpha 3$ H-2K, трансмембранный и цитозольный фрагменты	501
WPRE	посттрансляционный регуляторный элемент	676
TK-PA-terminator	сигнал полиаденилирования	271



**Рис. 1.** Схема линейного фрагмента frag CBH-b2m\_A0201-h2k ДНК, предназначенного для микроинъекций.  
**Fig. 1.** Scheme of a linear DNA fragment frag CBH-b2m\_A0201-h2k for microinjection.

**Таблица 2.** Наборы праймеров для детекции структурных фрагментов генной конструкции CBH-b2m-A0201-h2k у трансгенных мышей методом РВ-ПЦР  
**Table 2.** Sets of primers for detection of structural fragments of the CBH-b2m-A0201-h2k gene construct in transgenic mice using RT-PCR

	Праймер	Последовательность, 3'-5'	Положение в трансгене
1	hb2m F	TCACGTCATCCAGCAGAGAA	hb2m
	hb2m R	CGTCATGTCTCGATCCCACT	
	hb2m Z	ROX -CCATCCGACATTGAAGTTGACTTAC-BHQ-2	
2	H2K F	GGAGAAACACAGGTGAAAA	3'- фрагмент H2K
	H2K R	ACGGGAAGCAATAGCATGA	5'- фрагмент H2K
	H2K Z	ROX -CTCTCCCAGATTGTAAGTGATGGT-BHQ-2	
3	CBH F	5-TTACTCCCACAGGTGAGCG-3	CBH
	CBH R	5-AGCGAGACATGGTGGCTCT-3	
	CBH Z	ROX -CTGAGCAAGAGGTAAGGGTTTAAGG-BHQ-2	
4	WPRE F	5-GACGAGTCGGATCTCCCTT-3	WPRE
	WPRE R	5-TATCGACAGAGTGCCAGCC-3	
	WPRE Z	ROX -TAACTGAAACACGGAAGGAGACAAT-BHQ-2	

праймеров и флуоресцирующего зонда. В табл. 2 представлены нуклеотидные последовательности наиболее оптимальных праймеров и флуоресцентных зондов

для эффективной и высокоспецифичной детекции компонентов ГИК.

Для детекции наличия целевой модификации в геноме новой линии мышей —

**Таблица 3.** Олигонуклеотидные последовательности прямого и обратного праймера и флуоресцентного зонда для детектирования трансгена HLA-A\*02:01:01:01

**Table 3.** Oligonucleotide sequences of forward and reverse primers and fluorescent probe for detecting the HLA-A\*02:01:01:01 transgene

Название праймера/зонда	Олигонуклеотидная последовательность
b2mF	5'- TCCAGCGTACTCCAAAGATTCCAGGT-3'
02R1	5'-GTCAACTCTGTGGGTCTGACTGTGAGCTTTAC-3'
H B2mF	5'-TCACGTCATCCAGCAGAGAA -3'
H B2mR	5'-CGTCATGTCTCGATCCCACT-3'
H B2m Z (зонд)	ROX -CCATCCGACATTGAAGTTGACTTAC-BHQ-2

трансгена *HLA-A\*02:01:01:01* — были подобраны и оптимизированы пары праймеров и флуоресцентный зонд, представленные в табл. 3. С помощью первой пары можно верифицировать модификацию генома у полученных животных, подтверждая наличие аллель-специфической характеристики, тогда как вторая пара праймеров дает ответ на наличие человеческого β<sub>2</sub>-микроглобулина.

Стадию амплификации участка гена *HLA-A\*02:01:01:01* в режиме реального времени предполагается проводить в 25 мкл смеси на детектирующем амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США).

Состав реакционной смеси:

- ПЦР-буфер (×10): 700 мМТрис-НСl, рН 8,6 / 25°C, 166 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,
- 25 мМ MgCl<sub>2</sub>,
- 0,2 мМdNTPs,
- Taq-полимераза.

Предполагаемые условия проведения амплификации: начальная денатурация при 95°C — 15 мин, затем 50 циклов: 94°C — 30 сек., 58°C — 30 сек., 72°C — 30 сек.

Разработанная методика верификации трансгена *HLA-A\*02:01:01:01* у мышей новой линии позволяет быстро, качественно и однозначно определить наличие целевой модификации генома. Относительная простота и доступность реактивов и оборудования позволяют в короткие сроки провести генетический скрининг поголовья животных для дальнейшей селекционно-генетической работы по выведению чистой линии или иных целей.

### Дизайн системы для ПЦР детекции структурных фрагментов генной конструкции СВH-b2m-A0201-h2k у трансгенных мышей методом определения размеров амплификатов

ПЦР в реальном времени позволяет быстро и качественно определить наличие трансгена в тканях и органах, однако метод позволяет получить достаточно короткие ампликоны (как правило, около 200 п.н.) и не позволяет определять достаточно протяжённые участки генома. Для определения точной первичной последовательности ГИК в геноме мышей была разработана методика получения ампликонов, кодирующих основные функциональные части трансгена, с применением метода классической ПЦР. В табл. 4 представлены праймеры, используемые для классической ПЦР, а на рис. 2 — схема детекции основных функциональных частей ГИК.

Полученные таким образом ампликоны могут быть использованы в дальнейшем как для верификации наличия трансгена методами электрофоретического фракционирования ДНК и определения размера ампликонов, так и служить материалом для определения точной нуклеотидной последовательности методом секвенирования по Сэнгеру.

### Подтверждение соответствия трансгена HLA-A\*02:01:01:01 заявленной ГИК методом секвенирования по Сэнгеру

Секвенирование является одним из ключевых методов в арсенале молекулярной би-

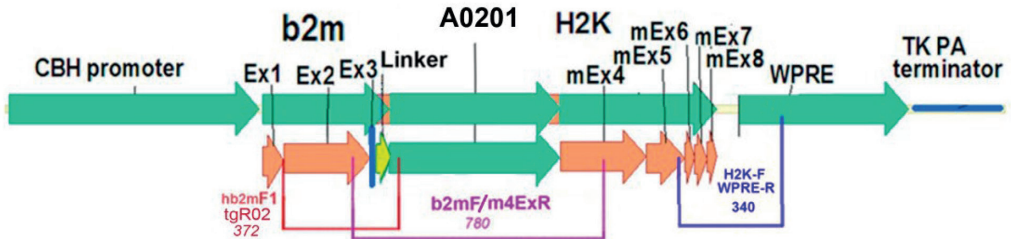


**Таблица 4.** Праймеры для ПЦР детекции структурных фрагментов генной конструкции *CBH-b2m-A0201-h2k\**  
**Table 4.** Primers for PCR structural fragments detection of the *CBH-b2m-A0201-h2k construct\**

№	Праймер	Последовательность 5'-3'	Соответствие ГИК	Размер, п.н
1	hb2mF1	TCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGT	b2m	372
	tgR02	TGGTGAAGAAGTACCTCATGC	HLA-A0201**	
2	b2mF	TGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACT	b2m	780
	m4ExR	AGCTCCTCCCCATTCAACTGCCA	H2K <sup>k</sup>	
3	H2K-F	TGTGATGAAGATGAGAAGGAGAAACA	H2K <sup>k</sup>	340
	WPRE-R	TCATAAAGAGACAGCAACCAGGATT	WPRE	

**Примечание:** \* — см. схему детекции, рис. 2; \*\* — праймер, высокоспецифичный для HLA-0201.

**Note:** \* — see diagram of detection, fig. 2; \*\* — primer, highly specific for the HLA-0201.



**Рис. 2.** Схема детекции структурных элементов конструкции *CBH-b2m-A0201-h2k* в геномном материале, выделенном из биологических образцов трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A\*02:01:01:01*.

**Fig. 2.** Scheme for structural elements detection of a *CBH-b2m-A0201-h2k* construct in genomic material isolated from biological samples of transgenic mice with the *HLA-A\*02:01:01:01* gene.

ологии, который позволяет точно установить первичную последовательность нуклеотидов в цепочке ДНК. Полученные при этом первичные данные с помощью специальных программ и анализа методами биоинформатики могут быть использованы для картирования ДНК, поиска последовательностей и других целей. В нашем случае использование данного метода позволяет подтвердить правильность нуклеотидной последовательности трансгена *HLA-A\*02:01:01:01* и её соответствие заявленной ГИК и соответствующему гену человека.

В качестве матрицы для секвенирования мы использовали кДНК, полученную из выделенного препарата мРНК образцов ткани внутренних органов и лимфоцитов крови мышей, несущих ген *HLA-A\*02:01:01:01*. Выбор кДНК обоснован тем, что данной

процедурой мы подтверждаем не просто наличие гена в геноме животного, но и активный синтез нашей конструкции в клетках, т. е. транскрипционную активность трансгена, что может косвенно свидетельствовать о функциональной активности конечного продукта — гибридной молекулы МНС класса I на поверхности клеток.

Сравнение нуклеотидных последовательностей трансгена *HLA-A\*02:01:01:01* из разных органов проводили выравниванием полученных сиквенсов относительно заявленной нуклеотидной последовательности генно-инженерной конструкции, а также гена *HLA-A\*02:01:01:01* человека. Секвенирование проводили с использованием и прямых, и обратных праймеров.

На рис. 3 и 4 представлен пример сиквенса с прямым праймером нуклеотидной последо-

вательности трансгена *HLA-A\*02:01:01:01*, полученной из образцов иммунокомпетентных органов и тканей — лимфоцитов крови (рис. 3а, 4а) и селезёнки (рис. 3б, 4б), с цветовым обозначением функциональных частей.

TKCAGATGTTA **GTGGGATCGAGACATGACGCGT** **GTTGGAGGTGGCAGTGGAGGTGGAG**  
**GCTCTGGTGGTGGAGGATCT** CACAGCATGAGGTACTTCTTACCAGCGTGTCCAGACCT  
GGCAGAGGTGAACCCAGGTTTCATTGCCGTTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTTTCG  
CTTCGACAGCGATGCTGCAAGTCAGAGGATGGAACCGAGAGCACCCCTGGATCGAGCAG  
GAAGGTCCTGAGTACTGGGATGGAGAGACCAGGAAGGTGAAAGCTCACAGTCAGACCC  
ACAGAGTTGACCTTGGAACTGAGAGGCTACTACAACCAGTCTGAGGCAGGCAGCCA  
CACAGTGCAGAGGATGTATGGCTGTGATGTTGGCAGCGACTGGAGGTTCTGAGAGGCT  
ACCATCAGTATGCCTACGATGGCAAGGACTACATTGCTCTGAAGGAGGACTTGAGAAGC  
TGGACAGCAGCTGACATGGCAGCACAGACCACCAAGCACAAAGTGGGAAGCTGCTCATG  
TTGCTGAGCAACTGAGAGCCTATCTGGAAGGCACCTGTGTGGAGTGGTTGAGACGCTAT  
CTGGAGAATGGCAAGGAGACCTTGCAGAGAACC **GATTCCCCAAAGGCTCATGTGACCC**  
GTCACAGCAGACCTGAAGATAAAGTCACCCCTGAGGTGCTGGGCTCT **CGGCTTCTACCC**  
GCTGACATCACCCCTGACCTGGCAGTTGATGGRRRRRRRRRSYWWA

а

TKCAGATGTTA **GTGGGATCGAGACATGACGCGT** **GTTGGAGGTGGCAGTGGAGGTGGAG**  
**GCTCTGGTGGTGGAGGATCT** CACAGCATGAGGTACTTCTTACCAGCGTGTCCAGACCT  
GGCAGAGGTGAACCCAGGTTTCATTGCCGTTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTTTCG  
CTTCGACAGCGATGCTGCAAGTCAGAGGATGGAACCGAGAGCACCCCTGGATCGAGCAG  
GAAGGTCCTGAGTACTGGGATGGAGAGACCAGGAAGGTGAAAGCTCACAGTCAGACCC  
ACAGAGTTGACCTTGGAACTGAGAGGCTACTACAACCAGTCTGAGGCAGGCAGCCA  
CACAGTGCAGAGGATGTATGGCTGTGATGTTGGCAGCGACTGGAGGTTCTGAGAGGCT  
ACCATCAGTATGCCTACGATGGCAAGGACTACATTGCTCTGAAGGAGGACTTGAGAAGC  
TGGACAGCAGCTGACATGGCAGCACAGACCACCAAGCACAAAGTGGGAAGCTGCTCATG  
TTGCTGAGCAACTGAGAGCCTATCTGGAAGGCACCTGTGTGGAGTGGTTGAGACGCTAT  
CTGGAGAATGGCAAGGAGACCTTGCAGAGAACC **GATTCCCCAAAGGCTCATGTGACCC**  
GTCACAGCAGACCTGAAGATAAAGTCACCCCTGAGGTGCTGGGCTCT **CGGCTTCTACCC**  
GCTGACATCACCCCTGACCTGGCAGTTGATGGRRRRRRRRRSYWWA

б

**Рис. 3.** Сиквенс с прямым праймером трансгена *HLA-A\*02:01:01:01*: а — лимфоциты крови, б — селезёнка. Цветом обозначены функциональные части трансгена: **hb2mg** — фрагмент бета-2-микроглобулина человека, **Linker** — линкер, **0201** — *HLA-A\*02:01:01:01*, **H2** — фрагмент *H2 K* мыши.

**Примечание:** обнаружена однонуклеотидная замена в области *H2*: триплет *CTT (Leu)* заменен на *CTC (Leu)* — без изменения аминокислотного состава конечного белка (выделена красным).

**Fig. 3.** Sequence with a forward primer of the *HLA-A\*02:01:01:01* transgene: а — blood lymphocytes, б — spleen. The color indicates the functional parts of the transgene: **hb2mg** — fragment of human beta-2-microglobulin, **Linker** — linker, **0201** — *HLA-A\*02:01:01:01*, **H2** — fragment of mouse *H2 K*.

**Note:** a single nucleotide substitution was detected in the *H2* region: the triplet *CTT (Leu)* was replaced by *CTC (Leu)* — without changing the amino acid composition of the final protein (highlighted in red).

Сравнение полученных из образцов тканей нуклеотидных последовательностей показало не только 100% соответствие (рис. 5) первичной последовательности заявленной ГИК и гену *HLA-A\*02:01:01:01* человека, но и отсутствие химеризма,

что является важным показателем наследуемого признака.

Таким образом, полученные животные несут полный и транскрипционно активный трансген *HLA-A\*02:01:01:01*, целиком соответствующий заявленной



**Рис. 4.** Сиквенс с прямым праймером b2mgF ПЦР-ампликонов ДНК мышей, несущих ген *HLA-A\*02:01:01:01*: а — лимфоциты крови, б — селезёнка.

Скриншоты окна программы Chromas: блоками выделены фрагменты фланкирующих *HLA-0201* последовательностей: сверху слева — линкер, внизу справа — H2-k.

**Fig. 4.** Sequence with forward primer PCR amplicons of b2mgF DNA from mice with *HLA A\*02:01:01:01*: a — blood lymphocytes, b — spleen.

Screenshots of program Chromas: fragments of *HLA-0201* flanking sequences are highlighted in blocks: top left — linker, bottom right — H2-k.

генно-инженерной конструкции и гену *HLA-A\*02:01:01:01* человека. Сравнение нуклеотидных последовательностей из разных органов расхождений в первичной структуре трансгена не выявило.

**Селекционная работа с животными, несущими трансген *HLA-A\*02:01:01:01*, в поколениях F1–F3**

Трудоёмкость процесса получения новых линий трансгенных животных накладывает ответственность на сотрудников вивария. Грамотная селекционная работа с полученными родоначальниками новой линии позволяет за обозримый период времени получить достаточное количество животных, покрывающих как нужды

Query	1261	GCATTCAGACTTGTCTTTTCAGCAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATT	1320
Query	1321	CACCCCCACTGAAAAAGATGAGTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTACAGCC	1380
Query	1381	CAAGATAGTTAAGTGGGATCGAGACATGACGCGTGGTGGAGGTGGCAGTGGAGGTGGAGG	1440
Sbjct	1	CTGGGATCGAGACATGACGCGTGGTGGAGGTGGCAGTGGAGGTGGAGG	48
Query	1441	CTCTGGTGGTGGAGGATCTCACAGCATGAGGTACTTCTTACCAGCGTGTCCAGACCTGG	1500
Sbjct	49	CTCTGGTGGTGGAGGATCTCACAGCATGAGGTACTTCTTACCAGCGTGTCCAGACCTGG	108
Query	1501	CAGAGGTGAACCCAGGTTTCATTGCCGTTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTTTCGCTT	1560
Sbjct	109	CAGAGGTGAACCCAGGTTTCATTGCCGTTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTTTCGCTT	168
Query	1561	CGACAGCGATGCTGCAAGTCAGAGGATGGAACCGAGAGCACCCCTGGATCGAGCAGGAAGG	1620
Sbjct	169	CGACAGCGATGCTGCAAGTCAGAGGATGGAACCGAGAGCACCCCTGGATCGAGCAGGAAGG	228
Query	1621	TCCTGAGTACTGGGATGGAGAGACCAGGAAGGTGAAAGCTCACAGTCAGACCCACAGAGT	1680
Sbjct	229	TCCTGAGTACTGGGATGGAGAGACCAGGAAGGTGAAAGCTCACAGTCAGACCCACAGAGT	288
Query	1681	TGACCTTGGAACTGAGAGGCTACTACAACCAGTCTGAGGCAGGCAGCCACACAGTGCA	1740
Sbjct	289	TGACCTTGGAACTGAGAGGCTACTACAACCAGTCTGAGGCAGGCAGCCACACAGTGCA	348
Query	1741	GAGGATGTATGGCTGTGATGTTGGCAGCGACTGGAGGTTCTGAGAGGCTACCATCAGTA	1800
Sbjct	349	GAGGATGTATGGCTGTGATGTTGGCAGCGACTGGAGGTTCTGAGAGGCTACCATCAGTA	408
Query	1801	TGCCATACGATGGCAAGGACTACATTGCTCTGAAGGAGGACTTGAGAAGCTGGACAGCAGC	1860
Sbjct	409	TGCCATACGATGGCAAGGACTACATTGCTCTGAAGGAGGACTTGAGAAGCTGGACAGCAGC	468
Query	1861	TGACATGGCAGCAGACACCACCAAGCACAAGTGGGAAGCTGCTCATGTTGCTGAGCAACT	1920
Sbjct	469	TGACATGGCAGCAGACACCACCAAGCACAAGTGGGAAGCTGCTCATGTTGCTGAGCAACT	528
Query	1921	GAGAGCCTATCTGGAAGGCACCTGTGTGGAGTGGTTGAGACGCTATCTGGAGAATGGCAA	1980
Sbjct	529	GAGAGCCTATCTGGAAGGCACCTGTGTGGAGTGGTTGAGACGCTATCTGGAGAATGGCAA	588
Query	1981	GGAGACCTTGAGAGAACCGATTCCCAAAGGCTCATGTGACCCGTACAGCAGACCTGA	2040
Sbjct	589	GGAGACCTTGAGAGAACCGATTCCCAAAGGCTCATGTGACCCGTACAGCAGACCTGA	648
Query	2041	AGATAAAGTCACCTGAGGTGCTGGGCTCTCGGCTTCTACCCTGCTGACATCACCTGAC	2100
Sbjct	649	AGATAAAGTCACCTGAGGTGCTGGGCTCTCGGCTTCTACCCTGCTGACATCACCTGAC	708
Query	2101	CTGGCAGTTGAATGGGAGGAGCTGACCCAGGACATGGAGCTTGTGGAGACCAGGCCTGC	2160
Sbjct	709	CTGGCAGTTGA	719
Query	2161	AGGAGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCATCTGTGGTCTGCTCTTGGGAAGGAGCAGTA	2220
Query	2221	CTACACATGCCATGTGTACCATCAGGGACTGCCTGAGCCTCTACCCTGAGATGGGAGCC	2280

**Рис. 5.** Сравнение нуклеотидной последовательности трансгена *hb2mg-Linker-0201-H2*, полученной из лимфоцитов крови, с соответствующей нуклеотидной последовательностью ГИК *CBH-b2m-A0201-H2K* (BLAST, Alien, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=HWE90DX711N>).

**Fig. 5.** Comparison of the nucleotide sequence of the *hb2mg-Linker-0201-H2* transgene from blood lymphocytes with the corresponding nucleotide sequence of the *CBH-b2m-A0201-H2K* construct (BLAST, Alien, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=HWE90DX711N>).

исследователей, так и ресурсный фонд племенных ядер для поддержания линии. Особую роль в процессе выведения новой линии играет внимательность при подборе пар, отбор наиболее перспективных племян и сублиний для размножения, а также обязательный генетический скрининг поголовья животных.

После микроинъекций ГИК в пронуклеусы зигот и трансплантации выживших эмбрионов псевдобеременным самкам-реципиентам нами была получена 91 живая особь, 18 из которых несли искомую модификацию генома. Соотношение полов среди трансгенных особей составило 1:1 (9 самцов и 9 самок). Для проведения селекционной работы и выведения новой линии были сформированы 18 сублиний. Самок и самцов поколения F0, несущих трансген *HLA-A\*02:01:01:01*, скрещивали с противоположным полом с гибридными особями линии CBA/Лас×C57Bl/6 (F1) в возрасте 2 мес. В результате скрещивания было получено 190 мышей (поколение F1), из которых 28 особей показали наличие гена *HLA-A\*02:01:01:01*.

Для дальнейшей селекционно-генетической работы и получения поколений F2–F3 в племядра отбирали положительных по трансгену *HLA-A\*02:01:01:01* особей предыдущего поколения по схеме инбредного скрещивания. В табл. 5 показана динамика передачи трансгена в поколениях F0–F3.

Из табл. 5 видно, как растёт процент трансгенных особей с увеличением поколения, что свидетельствует о стойком наследовании данного признака. По ходу селек-

ционно-генетической работы проводилась выбраковка сублиний и племян, имеющих низкий потенциал размножения и/или передачи признака. В качестве критериев для выбраковки нами были определены следующие: низкая сила экспрессии трансгена, невысокий показатель наследования трансгена, сниженные показатели фертильности и плодовитости (удлинённый репродуктивный цикл, небольшое количество детёнышей в помёте, каннибализм, неразвитый материнский инстинкт). Для выведения новой линии одновременно производится размножение животных трех поколений, не менее пяти племян в каждом, что соответствует стандартам разведения лабораторных мышей и позволяет безопасно наращивать поголовье животных без риска потерять линию. На сегодняшний день для активного размножения и выведения чистой линии выделены 3 сублинии, имеющие наилучшие показатели как по транскрипционной активности трансгена (силе экспрессии трансгена), так и по плодовитости и эффективности передачи признака в ряде поколений. Кроме того, генетический скрининг поголовья животных показал отсутствие химеризма при передаче искомого признака, а также наследование полной (т. е. с сохранением всех функциональных элементов, без потери каких-либо участков) генетической конструкции, что свидетельствует о стабильности передачи трансгена от поколения к поколению.

## Закключение

Нами была проведена работа по созданию методики эффективной и высокоспе-

**Таблица 5.** Динамика передачи трансгена и наращивания поголовья в трансгенной линии мышей, несущих ген *HLA-A\*02:01:01:01*

**Table 5.** Dynamics of transgene transmission and population growth in a transgenic line of mice with *HLA-A\*02:01:01:01* gene

Поколение	F0	F1	F2	F3
Доля трансгенных особей в поколении, %	20	15	46	68
Всего особей в поколении	91	190	98	156
Всего трансгенных особей в поколении	18	28	45	106

цифичной системы детекции трансгена *HLA-A\*02:01:01:01* у мышей новой гуманизированной трансгенной линии. Использование специально подобранных и адаптированных праймеров и метода ПЦР в реальном времени позволяет точно и относительно быстро определить наличие всех функционально значимых элементов ГИК в геноме мышей. Использование в РВ-ПЦР высокоспецифичных флуоресцентных зондов служит дополнительным контролем качества проведения исследования.

Далее методом секвенирования по Сэнгеру было показано полное соответствие первичной нуклеотидной последовательности трансгена *HLA-A\*02:01:01:01* заявленной ГИК и гену человека. Кроме того, для генетических исследований нами была использована кДНК, что говорит о транскрипционной активности трансгена и служит косвенным подтверждением функциональной активности конечного продукта — химерной молекулы МНС класса I на поверхности клеток мышей новой линии.

В ходе селекционно-генетической работы с животными новой линии проводился строгий отбор особей и сублиний для размножения. Дополнительно проводили генетический анализ на наличие полной ГИК в геноме и отсутствие химеризма в органах и тканях. Животные, имеющие низкий репродуктивный потенциал, сниженные показатели экспрессии трансгена и/или нарушения в первичной структуре ГИК, из размножения исключались. На сегодня для выведения новой гуманизированной трансгенной линии мышей, несущих ген *HLA-A\*02:01:01:01*, отобраны 3 сублинии, максимально соответствующие нашим критериям качества. В ряде поколений наблюдается постепенное увеличение доли особей, положительных по трансгену *HLA-A\*02:01:01:01*, что свидетельствует

об успешной реализации стратегии размножения и стойком полном наследовании искомого признака.

Созданная на базе НЦБМТ ФМБА новая гуманизированная трансгенная линия мышей, несущих ген *HLA-A\*02:01:01:01*, отражает популяционные особенности иммунного ответа, характерные для населения России. Однако анализ распределения аллелей главного комплекса гистосовместимости среди мировых популяций [7, 21] свидетельствует о наличии данной аллели в иных мировых сообществах, преимущественно, у европеоидов, что говорит об универсальности применения созданной биомодели для различных исследований в области медицины и фармакологии [8, 11, 20, 21]. Огромный опыт по биомоделированию социальнозначимых заболеваний [5] и созданию и верификации [1–4] гуманизированных трансгенных моделей позволяет НЦБМТ ФМБА России создавать уникальные биомодели, соответствующие современным стандартам качества. Успешное применение актуальных методов и подходов к биомоделированию позволяет в кратчайшие сроки реализовывать поставленные задачи. Контроль и совершенствование внутренних протоколов работы позволяют сохранять высокий уровень проведения научных исследований и строгое следование принципам 3R [18].

Таким образом, в настоящее время продолжается активная селекционно-генетическая работа по выведению новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A\*02:01:01:01*. Полученные животные могут быть использованы для различных исследований, включая исследования иммунных реакций, инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также разработки и тестирования вакцин и исследования в области фармакобезопасности и иммуногенности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Матвеев Е.Л., Петрова Н.В., Рябых В.П., Ревякин А.О., Станкова Н.В., Семёнов Х.Х. Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека NAT1 и NAT2. *Биомедицина*. 2016;1:74–84. [Karkischenko V.N., Bolotских L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabuh V.P., Revyakin A.O., Stankova N.V., Semenov H.H. Sozdanie liniy transgennykh zhivotnykh-modelej s genami cheloveka NAT1 i NAT2 [Creation of lines of transgenic animal models with human NAT1 and NAT2 genes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:74–84. (In Russian)].
2. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., Езерский В.А., Жукова О.Б., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека. *Биомедицина*. 2016;1:52–65. [Karkischenko V.N., Ryabuh V.P., Bolotских L.A., Semenov H.H., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Ezerskij V.A., Zhukova O.B., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Stolyarova V.N., Trubicina T.P. Fiziologo-embriologicheskie aspekty sozdaniya transgennykh myshej s integrirovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka [Physiological and Embryological Aspects of Creation of Transgenic Mice with Integrated Human NAT1 and NAT2 Genes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:52–65. (In Russian)].
3. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2) человека. *Биомедицина*. 2016;1:4–17. [Karkischenko V.N., Ryabuh V.P., Karkischenko N.N., Dulya M.S., Ezerskij V.A., Koloskova E.M., Lazarev V.N., Maksimenko S.V., Petrova N.V., Stolyarova V.N., Trubicina T.P. Molekulyarno-geneticheskie aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshej s integrirovannymi genami N-acetiltransferazy (NAT1 i NAT2) cheloveka [Molecular genetic aspects of the technology for obtaining transgenic mice with integrated human N-acetyltransferase (NAT1 and NAT2) genes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:4–17. (In Russian)].
4. Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В. Высокоспецифичные видовые праймеры к генам Nat1 и Nat2 для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных. *Биомедицина*. 2014;1(2):4–24. [Karkischenko N.N., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V. Vysokospetsifichnye vidovye prajmery k genam Nat1 i Nat2 dlya sravnitel'nykh issledovaniy u cheloveka i laboratornykh zhivotnykh [Highly specific species primers for the Nat1 and Nat2 genes for comparative studies in humans and laboratory animals]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(2):4–24. (In Russian)].
5. Помыткин И.А., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Нестеров М.С., Петрова Н.В. Модель фатального острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):24–33. [Pomytkin I.A., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Nesterov M.S., Petrova N.V. Model' fatal'nogo ostrogo porazheniya legkikh i ostrogo respiratornogo distress-sindroma [A Model of Fatal Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):24–33. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-16-4-24-33.
6. Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека *HLA-A\*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embriologicheskie aspekty sozdaniya novoj gumanizirovannoy transgennoj linii myshej s integrirovannym genom cheloveka *HLA-A\*02:01:01:01* [Embryological Aspects of Creation a New Humanized Transgenic Mice with Integrated human *HLA-A\*02:01:01:01* gene]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)].
7. Aigner B., et al. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *Journal of molecular medicine*. 2010;88:653–664.
8. Bai J., Wang J., Yang Y., Wang F., He A., Zhang W. Identification of HLA-A\*0201-restricted CTL Epitopes for MLLA-34-specific Immunotherapy for Acute Monocytic Leukemia. *J. Immunother*. 2021;44(4):141–150.
9. Beckford-Vera D.R., Gonzalez-Junca A., Janneck J.S., Huynh T.L., Blecha J.E., Seo Y., Li X., VanBroeklin H.F., Franc B.L. PET/CT Imaging of Human TNF $\alpha$  Using [89Zr] Certolizumab Pegol in a Transgenic Preclinical Model of Rheumatoid Arthritis. *Mol. Imaging Biol*. 2020;22(1):105–114.
10. Carter D.B., et al. Phenotyping of transgenic cloned piglets. *Cloning and stem cells*. 2002;4:131–145.
11. Chen Z., Ruan P., Wang L., Nie X., Ma X., Tan Y. T and B cell Epitope analysis of SARS-CoV-2 S protein based on immunoinformatics and experimental research. *J. Cell Mol. Med*. 2021.
12. Chu M.L., Moran E. The Limb-Girdle Muscular Dystrophies: Is Treatment on the Horizon? *Neurotherapeutics*. 2018;15(4):849–862.
13. Giraldo P., Rival-Gervier S., Houdebine L.M., Montoliu L. The potential benefits of insulators on heterologous constructs in transgenic animals. *Transgenic Res*. 2003;12:751–755.

14. Levedakou E.N., Popko B. Rewiring enervated: thinking LARGER than myodystrophy. *J. Neurosci. Res.* 2006;84(2):237–243.
15. Ma L., Wang Y., Wang H., Hu Y., Chen J., Tan T., Hu M., Liu X., Zhang R., Xing Y., Zhao Y., Hu X., Li N. Screen and Verification for Transgene Integration Sites in Pigs. *Sci. Rep.* 2018;8(1):7433.
16. Paquet D., Kwart D., Chen A., et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature.* 2016;533:125–129.
17. Rogers C.S., et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science.* 2008;321:1837–1841.
18. Russell W.M.S. BRL. The Principles of Humane Experimental Technique. *Med. J. Aust. [Internet].* 1960;1(13):500.
19. Schroder A.R.W., et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 2002;110:521–529.
20. Thomas R., Shaath H., Naik A., Toor S.M., Elkord E., Decock J. Identification of two HLA-A\*0201 immunogenic epitopes of lactate dehydrogenase C (LDHC): potential novel targets for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2020;69(3):449–463.
21. Valkenburg S.A., Josephs T.M., Clemens E.B., Grant E.J., Nguyen T.H., Wang G.C., Price P.A., Miller A., Tong S.Y., Thomas P.G., Doherty P.C., Rossjohn J., Gras S., Kedzierska K. Molecular basis for universal HLA-A\*0201-restricted CD8<sup>+</sup> T-cell immunity against influenza viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016;113(16):4440–4445.
22. van Vuuren A.J., van Roon J.A., Walraven V., Stuij I., Harmsen M.C., McLaughlin P.M., van de Winkel J.G., Thepen T. CD64-directed immunotoxin inhibits arthritis in a novel CD64 transgenic rat model. *J. Immunol.* 2006;176(10):5833–5838.
23. Yang D.S., et al. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19:3983–3994.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Каркищенко Николай Николаевич**, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, акад. РАН и Международной академии астронавтики (Париж), ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;  
**e-mail:** [niknik2808@yandex.ru](mailto:niknik2808@yandex.ru)

**Глотова Елена Сергеевна\***, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;  
**e-mail:** [savelaine@gmail.com](mailto:savelaine@gmail.com)

**Петрова Наталья Владимировна**, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;  
**e-mail:** [m-sklad@yandex.ru](mailto:m-sklad@yandex.ru)

**Слободенюк Владимир Владимирович**, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;  
**e-mail:** [prof-v-iprim@mail.ru](mailto:prof-v-iprim@mail.ru)

**Ларюшина Надежда Андреевна**, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;  
**e-mail:** [kichi09@mail.ru](mailto:kichi09@mail.ru)

**Nikolay N. Karkischenko**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of the RAS, Acad. of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Acad. of the International Academy of Astronautics (Paris), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [niknik2808@yandex.ru](mailto:niknik2808@yandex.ru)

**Elena S. Glotova\***, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [savelaine@gmail.com](mailto:savelaine@gmail.com)

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

**Vladimir V. Slobodenyuk**, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [prof-v-iprim@mail.ru](mailto:prof-v-iprim@mail.ru)

**Nadezhda A. Laryushina**, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [kichi09@mail.ru](mailto:kichi09@mail.ru)



**Петров Дмитрий Валерьевич**, ФГБУН  
«Научный центр биомедицинских технологий  
ФМБА России»;

**e-mail:** [1941-65@mail.ru](mailto:1941-65@mail.ru)

**Dmitry V. Petrov**, Scientific Center of Biomedical  
Technologies of the Federal Medical and Biological  
Agency of Russia;

**e-mail:** [1941-65@mail.ru](mailto:1941-65@mail.ru)

**Васильева Ирина Андреевна**, ФГБУН  
«Научный центр биомедицинских технологий  
ФМБА России»;

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

**Irina A. Vasil'eva**, Scientific Center of Biomedical  
Technologies of the Federal Medical and Biological  
Agency of Russia;

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

**Дерябин Кирилл Егорович**, ФГБУН «Науч-  
ный центр биомедицинских технологий ФМБА  
России»;

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

**Kirill E. Deryabin**, Scientific Center of Biomedical  
Technologies of the Federal Medical and Biological  
Agency of Russia;

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

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ПИЩЕВАЯ ДОБАВКА НА ОСНОВЕ ВИТАМИНА В<sub>9</sub> НОРМАЛИЗУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ — РЕГУЛЯТОРОВ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ ДИЕТЫ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ХОЛЕСТЕРИНА

А.Е. Бурова<sup>1,\*</sup>, А.П. Рейх<sup>2,\*</sup>, А.В. Горлова<sup>1,2</sup>, Е.П. Свиринов<sup>1,2</sup>, К.Н. Забегалов<sup>1,2</sup>,  
К.Д. Чапров<sup>2</sup>, А.Е. Умрюхин<sup>2</sup>, Т.В. Стрекалова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»  
125315, Российская Федерация, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»  
Минздрава России (Сеченовский Университет)  
119991, Российская Федерация, Москва, ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4

«Западная диета» (ЗД) — режим питания с избытком холестерина, насыщенных жирных кислот и легкоусвояемых сахаров — может вызывать диабет 2-го типа, метаболический синдром и другие заболевания, особенно при старении. Актуальным является поиск способов стабилизации метаболизма при ЗД, однако экспериментальных работ на данную тематику проделано немного. Нами были изучены потенциальные эффекты пищевой добавки на основе дихолин сукцината (ДС) и фолиевой кислоты (витамина В<sub>9</sub>) — активаторов митохондриальной функции — в мышинной модели ЗД. Изучалась толерантность к глюкозе, показатели гиппокамп-зависимого поведения и относительная экспрессия генов — маркеров негативных эффектов ЗД в мозге и печени стареющих мышей, содержащихся на аналоге ЗД. Мыши C57BL/6 в возрасте 12 мес. содержались на ЗД в течение 3 недель; часть групп получала В<sub>9</sub> (5 мг/кг/сут), ДС (150 мг/кг/сут) либо их комбинацию с водой. Проводили тесты извлечения пищевых гранул из цилиндра и кондиционированного страха, далее методом ПЦР «в реальном времени» исследовали экспрессию генов в печени и префронтальной коре. Было показано снижение толерантности к глюкозе у мышей, содержащихся на ЗД, повышение скорости извлечения гранул из цилиндра и укорочение замирания в тесте кондиционированного страха, что может указывать на снижение когнитивных функций и повышенную импульсивность. Применение ДС и В<sub>9</sub> предотвратило часть изменений. При содержании на ЗД оказалась значимо повышена экспрессия гена *FASN* в печени, таким образом мы выявили новые молекулярные механизмы негативных эффектов ЗД при старении. Пищевая добавка на основе В<sub>9</sub> и ДС частично нормализовала экспрессию *FASN*, а также поведенческие показатели и толерантность к глюкозе при подаче ЗД. Наши результаты открывают перспективы дальнейшего исследования терапевтического и профилактического влияния компонентов данной пищевой добавки на регуляцию метаболических показателей при старении.

**Ключевые слова:** «западная диета» (ЗД), дихолин сукцинат, фолиевая кислота, липидный обмен, толерантность к глюкозе

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

**Финансирование:** работа поддержана Государственными заданиями ФГФУ-2022-0013 и № 121042 600278-7.

**Для цитирования:** Бурова А.Е., Рейх А.П., Горлова А.В., Свиринов Е.П., Забегалов К.Н., Чапров К.Д., Умрюхин А.Е., Стрекалова Т.В. Пищевая добавка на основе витамина В<sub>9</sub> нормализует экспрессию генов — регуляторов липидного обмена в мышинной модели диеты с высоким содержанием холестерина. *Биомедицина*. 2023;19(3E):25–30. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-25-30>

Поступила 07.04.2023

Принята после доработки 19.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## A VITAMIN B<sub>9</sub>-BASED DIETARY SUPPLEMENT NORMALIZES THE EXPRESSION OF LIPID METABOLISM REGULATORY GENES IN A MOUSE MODEL OF A HIGH-CHOLESTEROL DIET

Alisa E. Burova<sup>1,\*</sup>, Aleksandra P. Reykh<sup>2,\*</sup>, Anna V. Gorlova<sup>1,2</sup>, Evgeniy P. Svirin<sup>1,2</sup>,  
Konstantin N. Zabegalov<sup>1,2</sup>, Kirill D. Chaprov<sup>2</sup>, Aleksei E. Umrukhin<sup>2</sup>,  
Tatiana V. Strekalova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology  
125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya Str., 8

<sup>2</sup> Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia  
119991, Russian Federation, Moscow, Bolshaya Pirogovskaya Str., 2/4

The Western Diet (WD) is a nutritional style characterized by excessive intake of cholesterol, saturated fatty acids and sugars; this nutritional pattern can cause type 2 diabetes, metabolic syndrome and other disorders, particularly during ageing. The search for effective approaches to managing the metabolic syndrome caused by WD seems to be a relevant research task. Unfortunately, this issue has attracted insufficient attention in the current literature. In this work, we use a mouse model of WD to study potential effects of a food supplement based on dicholine succinate (DS) and folic acid (vitamin B<sub>9</sub>), which are activators of mitochondrial functions. We study glucose tolerance, parameters of hippocampus-dependent learning and relative gene expression in RT-PCR of molecular markers of negative WD effects in the brain and liver of aging mice housed on WD. Mice C57BL/6 were 12 months old and housed on WD for 3 weeks; some groups received B<sub>9</sub> (5 mg/kg/day) or DS (150 mg/kg/day), or their combination, via water. We carried out food displacement and fear conditioning learning tests followed by RT-PCR of several genes in the liver and brain. We found a decreased glucose tolerance, an elevated speed of pellet displacement and a reduction of freezing time in the fear conditioning test. This may suggest cognitive deficits and impulsivity of mice housed on WD. The administration of DS and B<sub>9</sub> diminished most of these changes. In addition, the increased expression of *FASN* in the liver points to new mechanisms of negative WD effects during aging. The food supplement based on B<sub>9</sub> and DS normalizes *FASN* expression and behavior, as well as glucose tolerance in WD-housed mice. Our results open new perspectives for further studies of therapeutic and preventive effects of food supplements on the regulation of metabolic parameters during ageing.

**Keywords:** western diet, dicholine succinate, folic acid, lipid metabolism, glucose tolerance

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

**Funding:** the work was carried out as part of the State tasks of FGFU-2022-0013 and No. 121042600278-7.

**For citation:** Burova A.E., Reykh A.P., Gorlova A.V., Svirin E.P., Zabegalov K.N., Chaprov K.D., Umrukhin A.E., Strekalova T.V. A Vitamin B<sub>9</sub>-based Dietary Supplement Normalizes the Expression of Lipid Metabolism Regulatory Genes in a Mouse Model of a High-cholesterol Diet. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):25–30. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-25-30>

Submitted 07.04.2023

Revised 19.05.2023

Published 06.11.2023

### Введение

В последнее время т.н. «западная диета» (ЗД) как стиль питания приобретает все большую распространенность по всему миру. Одной из отличительных черт ЗД является потребление пищи с повышенным содержанием жиров и холестерина, а так-

же сахаров. Показано, что данный стиль питания ведет к возникновению метаболических нарушений, таких как ожирение и диабет.

В наших исследованиях было показано, что 3-недельная ЗД индуцирует повышенную тревожность и депрессивно-подобное

поведение у мышей в поведенческих тестах «Темно-светлая камера» и «Вынужденное плавание» [6], а также приводит к возрастанию импульсивности, снижению социальных взаимодействий и нарушениям памяти [7]. Также нами было выявлено снижение толерантности к глюкозе у мышей, содержащихся на ЗД. Фармакологическая активация инсулин-зависимой передачи посредством дихолин сукцината (ДС) предотвращала развитие депрессивно-подобного и тревожного поведения у опытных животных, восстанавливала до уровня нормы экспрессию молекулярного маркера снижения митохондриальной активности — коактиватора-1b гамма-рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором (PPARGC1b), и Толл-лайн рецептора-4 (TLR4) [6]. В особенности негативные эффекты были выражены при старении [4].

Установлено, что ДС известен своим активирующим эффектом на инсулиновый рецептор. Ранее было изучено воздействие ДС в двух дозах — 50 и 180 мг/кг/день — при подаче с питьевой водой молодым мышам [6]. Применение ДС в дозе 50 мг/кг/день привело у мышей к частичной нормализации показателей поведения в О-образном лабиринте, а в тесте «вынужденного плавания» привело к нормализации показателей «беспомощности».

В данной работе мы изучали эффективность пищевой добавки на основе ДС и витамина фолиевой кислоты (В<sub>9</sub>), представляющей собой их комбинацию, на негативные последствия потребления ЗД у стареющих мышей. Предположительно, эта комбинация могла улучшить метаболические параметры, купировать поведенческие нарушения и вернуть к нормальным показателям экспрессию генов — регуляторов липидного обмена *GCN2*, *SREBP1*, *FASN*, *DNMT1* в печени и мозге, поскольку В<sub>9</sub> оказывает существенное влияние на обмен холестерина [3].

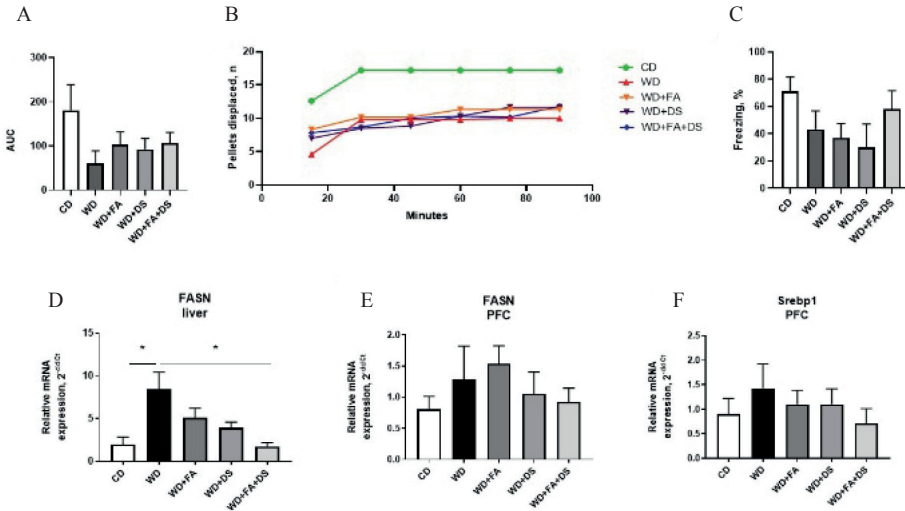
## Материалы и методы

Мыши линии C57BL/6 в возрасте 12 мес. содержались на ЗД в течение 3 недель, как описано ранее [6]; часть групп одновременно получала В<sub>9</sub> (5 мг/кг/сут), ДС (150 мг/кг/сут) либо их комбинацию с водой. Были проведены тесты извлечения пищевых гранул из цилиндра и кондиционированного страха — классические тесты на гиппокамп-зависимое поведение у мышей, а также тест на толерантность к глюкозе. Далее был произведен забор печени и префронтальной коры для исследования генной экспрессии выбранных молекулярных маркеров: *GCN2*, *SREBP1*, *FASN*, *DNMT1* [1]. Статистический анализ проводился методом однофакторной ANOVA ( $p < 0,05$ ).

## Результаты и их обсуждение

Нами было показано снижение толерантности к глюкозе у мышей (рис. А), содержащихся на ЗД, сопровождающееся снижением скорости извлечения гранул из цилиндра (рис. В) и времени замирания в тесте кондиционированного страха (рис. С), что может указывать на снижение когнитивных функций экспериментальных животных либо их повышенную импульсивность ( $p < 0,05$ ). При этом применение комбинации ДС и В<sub>9</sub> позволило предотвратить часть указанных изменений ( $p < 0,05$ ).

Кроме того, экспрессия гена *FASN* в печени оказалась значимо повышена ( $p < 0,05$ ; рис. D) при содержании на ЗД ( $p < 0,05$ ), однако не отличалась от контрольного уровня в группе, получавшей пищевую добавку. В образцах префронтальной коры схожие тенденции наблюдались в экспрессии обоих генов *SREBP1* и *FASN* (рис. E, F), что, возможно, обуславливает описанные поведенческие нарушения. Подобные эффекты не были столь выражены в группах, получавших ДС либо В<sub>9</sub> отдельно.



**Рис.** Эффекты «западной диеты» при подаче ДС и  $B_6$ . (A) Уровень толерантности к глюкозе. (B) Динамика извлечения гранул. (C) Процент замирания у мышей в тесте кондиционированного страха. Экспрессия гена *FASN* (D) в печени и (E) в префронтальной коре. (F) Экспрессия гена *SREBP1* в префронтальной коре.

**Fig.** The effects of WD in DS — and  $B_6$ -treated mice. (A) Glucose tolerance. (B) Dynamics of food pellets displacement. (C) Freezing response in the contextual fear conditioning test. Expression of *FASN* (D) in the liver and (E) in the prefrontal cortex. (F) Expression of *SREBP1* in the prefrontal cortex.

## Заключение

Таким образом, мы исследовали гены — регуляторы липидного обмена *SREBP1* и *FASN*, среди которых первый предположительно обуславливает негативные эффекты ЗД при старении. Пищевая добавка на основе  $B_6$  частично нормализовала их экспрессию, а также изменения поведения и толерантность к глюкозе на фоне ЗД. Наши результаты открывают перспективы дальнейшего исследования влияния компонентов данной пищевой добавки и их ком-

бинации в низких дозах на регуляцию метаболических показателей и когнитивных функций [2]. Предположительно, комбинация данных соединений в низких дозах может улучшить метаболические параметры у пожилых людей, купировать поведенческие нарушения и метаболические параметры по аналогии с другими воздействиями [5]. Также мы показали, что *SREBP1* и *FASN* могут использоваться как маркеры негативных эффектов ЗД на мозг и печень при старении.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Cline B.H., Costa-Nunes J.P., Cespuglio R., Markova N., Santos A.I., Bukhman Y.V., Kubatiev A., Steinbusch H.W.M., Lesch K.-P., Strelakova T. Frontiers in Behavioral Neuroscience. *FEBS*. 2015;9.
- Ferreira D.F., Fiamoncini J., Prist I.H., Ariga S.K., de Souza H.P., de Lima T.M. Novel role of TLR4 in NAFLD development: Modulation of metabolic enzymes expression. *Biochem, Biophys, Acta*. 2015;1851(10):1353–1359.
- Leclerc D., Jelinek J., Christensen K.E., Issa J.J., Rozen R. High folic acid intake increases methylation-dependent expression of Lsr and dysregulates hepatic cholesterol homeostasis. *J. Nutr. Biochem*. 2021;88:108554.
- Poggini S., Golia M.T., Alboni S., Milior G., Sciarria L.P., Viglione A., Matte Bon G., Brunello N., Puglisi-Allegra S., Limatola C., Maggi L., Branchi I. Combined Fluoxetine and Metformin Treatment Potentiates Antidepressant Efficacy Increasing IGF2 Expression in the Dorsal Hippocampus. *Neural. Plast.* 2019;2019:4651031.

- Rao S., Yang X., Ohshiro K., Zaidi S., Wang Z., Shetty K., Xiang X., Hassan M.I., Mohammad T., Latham P.S., Nguyen B.N., Wong L., Yu H., Al-Abed Y., Mishra B., Vacca M., Guenigault G., Allison M.E.D., Vidal-Puig A., Benhammou J.N., Alvarez M., Pajukanta P., Pisegna J.R., Mishra L.  $\beta_2$ -spectrin (SPTBN1) as a therapeutic target for diet-induced liver disease and preventing cancer development. *Sci. Transl. Med.* 2021;13(624):eabk2267.
- Strekalova T., Costa-Nunes J.P., Veniaminova E., Kubatiev A., Lesch K.P., Chekhonin V.P., Evans M.C., Steinbusch H.W. Insulin receptor sensitizer, dicholine succinate, prevents both Toll-like receptor 4 (TLR4) upregulation and affective changes induced by a high-cholesterol diet in mice. *J. Affect Disord.* 2016;196:109–116.
- Veniaminova E., Cespuglio R., Cheung C.W., Umriukhin A., Markova N., Shevtsova E., Lesch K.P., Anthony D.C., Strekalova T. Autism-Like Behaviours and Memory Deficits Result from a Western Diet in Mice. *Neural. Plast.* 2017:9498247.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Бурова Алиса Евгеньевна\***, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;  
e-mail: [burova.ae@phystech.edu](mailto:burova.ae@phystech.edu)

**Alisa E. Burova\***, Institute of General Pathology and Pathophysiology;  
e-mail: [burova.ae@phystech.edu](mailto:burova.ae@phystech.edu)

**Рейх Александра Павловна\***, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
e-mail: [alexandrareykh@mail.ru](mailto:alexandrareykh@mail.ru)

**Aleksandra P. Reykh\***, Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [alexandrareykh@mail.ru](mailto:alexandrareykh@mail.ru)

**Горлова Анна Вячеславовна**, к.б.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
e-mail: [anna.gorlova204@gmail.com](mailto:anna.gorlova204@gmail.com)

**Anna V. Gorlova**, Cand. Sci. (Biol.), Institute of General Pathology and Pathophysiology, Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [anna.gorlova204@gmail.com](mailto:anna.gorlova204@gmail.com)

**Свирин Евгений Павлович**, к.б.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
e-mail: [jogikint@gmail.com](mailto:jogikint@gmail.com)

**Evgeniy P. Svirin**, Cand. Sci. (Biol.), Institute of General Pathology and Pathophysiology, Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [jogikint@gmail.com](mailto:jogikint@gmail.com)

**Забегалов Константин Николаевич**, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
e-mail: [konstantin.n.zabegalov@gmail.com](mailto:konstantin.n.zabegalov@gmail.com)

**Konstantin N. Zabegalov**, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [konstantin.n.zabegalov@gmail.com](mailto:konstantin.n.zabegalov@gmail.com)

**Чапров Кирилл Дмитриевич**, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
**e-mail:** [chapkir@gmail.com](mailto:chapkir@gmail.com)

**Kirill D. Chaprov**, Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
**e-mail:** [chapkir@gmail.com](mailto:chapkir@gmail.com)

**Умрюхин Алексей Евгеньевич**, д.м.н., проф., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
**e-mail:** [alum1@yandex.ru](mailto:alum1@yandex.ru)

**Aleksei E. Umrukhin**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
**e-mail:** [alum1@yandex.ru](mailto:alum1@yandex.ru)

**Стрекалова Татьяна Валерьевна**, к.м.н., проф., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
**e-mail:** [t.strekalova@maastrichtuniversity.nl](mailto:t.strekalova@maastrichtuniversity.nl)

**Tatiana V. Strekalova**, Cand. Sci. (Med.), Prof., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
**e-mail:** [t.strekalova@maastrichtuniversity.nl](mailto:t.strekalova@maastrichtuniversity.nl)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-31-35>



## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРЕССПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЛЕЙ ЛИТИЯ В ТЕСТЕ «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ»

А.А. Дельцов\*, С.В. Позябин

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной  
медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина»  
109472, Российская Федерация, Москва, ул. Академика Скрябина, 23

Системная реакция на стресс, направленная на устранение или ослабление стресса, сопровождается изменениями поведенческих, вегетативных, двигательных, сенсорных, когнитивных и других функций организма. Поведение при стрессе является неотъемлемой частью общего поведения. Цель исследования: изучить поведенческую активность в тесте «Открытое поле» у крыс на фоне применения различных солей лития. В ходе проведенных исследований было установлено, что курсовое применение органических солей лития улучшает мотивационные характеристики поведения, внешний вид крыс, достоверно повышает ориентировочно-исследовательское поведение подопытных животных, снижает уровень тревоги, страха, неуверенности, что в целом можно охарактеризовать как адаптационно-стимулирующее влияние. При этом прослеживается тенденция накопительного действия препарата. Особенно выражен анаболический эффект оротата лития, позволяющий повысить приросты живой массы тела на фоне воздействия стрессов различной этиологии.

**Ключевые слова:** крысы, открытое поле, сукцинат лития, аскорбат лития, оротат лития, карбонат лития, стресс, адаптация

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

**Для цитирования:** Дельцов А.А., Позябин С.В. Сравнительный анализ стресспротекторного действия солей лития в тесте «Открытое поле». *Биомедицина*. 2023;19(3E):31–35. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-31-35>

Поступила 11.05.2023

Принята после доработки 31.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## COMPARATIVE ANALYSIS OF THE STRESS PROTECTIVE EFFECT OF LITHIUM SALTS IN AN OPEN FIELD TEST

Alexandr A. Deltsov\*, Sergey V. Pozyabin

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K.I. Skryabin  
109472, Russian Federation, Moscow, Akademika Skryabina Str., 23

Systemic response to stress, aimed at eliminating or reducing stress, is accompanied by changes in behavioral, vegetative, motor, sensory, cognitive, and other bodily functions. Stress behavior is an integral part of general behavior. In this work, we set out to study the behavioral activity of rats in an open field test following administration of various lithium salts. The conducted experiments showed that a course application of organic lithium salts improves the motivational characteristics of behavior and the appearance of rats, significantly increases the tentative research behavior of experimental animals, and reduces the level of anxiety, fear, and uncertainty, which can be characterized as an adaptive-stimulating effect. At the same time, the drug demonstrates a cumulative effect. The anabolic effect of lithium orotate is particularly pronounced, which makes it possible to increase body weight gains in the setting of stress of various etiologies.



**Keywords:** rats, open field test, lithium succinate, lithium ascorbate, lithium orotate, lithium carbonate, stress, adaptation

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

**For citation:** Deltsov A.A., Pozyabin S.V. Comparative Analysis of the Stress Protective Effect of Lithium Salts in an Open Field Test. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):31–35. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-31-35>

Submitted 11.05.2023

Revised 31.05.2023

Published 06.11.2023

## Введение

Актуальной задачей ветеринарной науки и практики в современных условиях является изыскание и фармакологическое изучение новых препаратов для предупреждения стрессогенной патологии и коррекции защитно-приспособительных реакций, доступных широкому применению в животноводстве. Неорганические соли (хлорид, карбонат) вследствие сравнительно малых размеров аниона в принципе не могут проявлять высокоспецифичных взаимодействий с белками протеома или с другими макромолекулами. В отличие от неорганических солей, соли с органическими анионами (сукцинат, аскорбат, оротат), способные к более специфическим взаимодействиям с белками, обеспечивают более эффективный транспорт ионов лития внутрь клетки и, кроме того, могут также проявлять специфические эффекты [2, 3].

Поведение при стрессе является неотъемлемой частью общего поведения, при этом сдвиг поведенческого реагирования происходит в сторону крайних состояний возбуждения — торможения центральной нервной системы и укладывается в единую шкалу этологической активности «стресс — страх — тревожность — депрессия» [5]. Одним из таких тестов, который используется в настоящее время в основном в составе батареи тестов, является тест «Открытое поле» [4]. Тест «Открытое поле», применяемый в соответствии с протоколом для скрининга фармпрепаратов и фенотипирования животных, позволяет

выявлять значительные нарушения в нервно-мышечной, сенсорной и вегетативной системах организма и оценивать более тонкие функциональные изменения, связанные с индивидуальным и социальным поведением животных [1].

**Цель исследования** — изучить поведенческую активность в тесте «Открытое поле» у крыс на фоне применения различных солей лития.

## Материалы и методы

Опыты проводили на 60 белых нелинейных крысах-самцах 85-дневного возраста массой тела 220–230 г на кафедре физиологии, фармакологии и токсикологии им. А.Н. Голикова и Е.И. Мозгова ФГБОУ ВО «МГАВМиБ — МВА имени К.И. Скрябина». Температура воздуха поддерживалась в пределах 18–23 °С при относительной влажности 45–60%. Доступ к воде и корму был свободным. Группы формировали по принципу аналогов, используя в качестве критерия массу тела (различие по средней массе не превышало 10–12%).

Перед отбором в группы крысы были протестированы в «Открытом поле» для определения уровня «эмоциональности», после чего было сформировано 6 групп животных по 10 особей в каждой. Первая группа — контрольная, вторая — интактная, 4 опытных. Контрольной группе вводили физ. р-р. Опытным группам вводили перорально соли лития в дозировке 10 мг/кг живой массы тела: 1 — карбонат лития, 2 — сук-

цинат лития, 3 — аскорбат лития, 4 — оротат лития. Препарат вводили однократно, до утреннего кормления, с помощью внутрижелудочного зонда, на протяжении 7 сут.

Результаты обрабатывали, используя программные продукты Excel\_03 и Statistica 8.0, подсчитывая  $M \pm m$ , достоверность различий между группами определяли по непараметрическому критерию U Вилкоксона–Манна–Уитни.

### Результаты и их обсуждение

В ходе исследования проводили оценку влияния препаратов на характеристики поведения животных путем сопоставления величин с контрольной и интактной группами после курсового применения изучаемых соединений. Результаты исследований представлены в табл. 1.

У крыс первой опытной группы (карбонат лития) отсутствовали какие-либо достоверные изменения по сравнению с контрольной группой. Животные выглядели подавленно, пытались забиться в угол, была снижена поисковая активность. У интактных животных, несмотря на помещение в новое пространство, была довольно высокая поисковая активность, с выходом в центр тестовой

установки. Высокую активность проявили животные, которым вводили органические соли лития. Достоверное повышение двигательной активности наблюдается в тех группах, где применяли сукцинат, аскорбат и оротат лития (горизонтальная активность была выше на 17,3–28,5%, вертикальная — от 80,1% до двух раз).

Исследовательская активность по показателю «норка» у крыс опытных групп № 4–6 также увеличилась в 2,0–2,7 раза по сравнению с контролем. Интенсивность груминга в первой опытной группе увеличилась в 2 раза, а в третьей — в 1,8 раза (по сравнению с остальными опытными группами). Эмоциональная реакция (дефекации) снижается в опытных группах № 4–6 (в 1,8 раза ниже по сравнению с контрольной группой). Показатель «выход в центр» по методике «Открытое поле» является одной из характеристик ориентировочно-исследовательского поведения.

Ветеринарно-манипуляционный и адаптационный стресс у экспериментальных животных проявляется изменением средней живой массы, выраженной в средне-суточных приростах. Применение органических солей лития в значительной мере

**Таблица 1.** Влияние солей лития на объем и структуру поведения крыс в тесте «Открытое поле» при курсовом пероральном введении ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

**Table 1.** The effect of lithium salts on the volume and structure of rat behavior in the “Open field” test with course oral administration ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Группы	ГДА	ВДА	Норка	Выход в центр	Груминг	Болюсы
1. Контроль	23,10±2,28	5,44±0,67	4,88±0,72	0	7,63±1,00	2,25±0,25
2. Интакт	27,00±1,27	7,25±0,37	6,63±0,38	1,16±0,28	6,84±0,42	1,89±0,31
3. $\text{Li}_2\text{CO}_3$	23,60±1,11	5,43±0,75	4,75±0,58	0	7,25±0,88	2,13±0,40
4. $\text{C}_4\text{H}_4\text{Li}_2\text{O}_4$	29,70±2,54	10,90±0,72*	7,38±0,96*	2,71±0,27*	3,58±0,50*	1,05±0,31
5. $\text{C}_6\text{H}_7\text{LiO}_6$	29,40±2,01	10,30±1,13*	7,63±0,28*	2,13±0,30*	3,50±0,38*	1,15±0,62
6. $\text{C}_5\text{H}_3\text{LiN}_2\text{O}_4$	29,10±1,75	9,88±0,77*	7,12±0,54*	2,09±0,14*	3,79±0,16*	1,13±0,40

**Примечание:** ГДА — горизонтальная двигательная активность; ВДА — число подъемов животного на задние конечности; норки — количество отверстий, в которые крысы заглянула или обнюхала; выход в центр — пересечение центральных квадратов; груминг — количество умываний; болюсы — число болюсов (дефекаций).

**Note:** ГДА — horizontal motor activity; ВДА — the number of lifts of the animal onto its hind limbs; норка — the number of holes into which the rat looked or sniffed; выход в центр — intersection of central squares; груминг — the number of washes; болюсы — number of boluses (defecations).

**Таблица 2.** Динамика весовых показателей и среднесуточных приростов у крыс на фоне применения солей лития ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

**Table 2.** Dynamics of weight indicators and average daily gains in rats against the background of the use of lithium salts ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )

Группы	Начальная масса (г)	Масса после курсового введения (г)	% прироста (г)	Прирост за период (г)	Среднесуточный прирост (г)
1. Контроль	221,10±1,12	220,90±3,12	-0,1	-0,2±0,05	0
2. Интакт	222,00±2,24	224,90±2,16	+1,3	2,9±0,4	0,36±0,11
3. $\text{Li}_2\text{CO}_3$	220,40±2,45	221,90±1,98	+0,7	1,5±0,7	0,19±0,09
4. $\text{C}_4\text{H}_4\text{Li}_2\text{O}_4$	220,60±1,98	225,90±3,24	+2,4	5,3±0,8	0,66±0,10
5. $\text{C}_6\text{H}_7\text{LiO}_6$	221,40±2,08	228,50±3,18	+3,2	7,1±0,6	0,89±0,08
6. $\text{C}_5\text{H}_3\text{LiN}_2\text{O}_3$	220,30±1,67	256,40±5,24*	+16,4	36,1±1,2	4,51±0,56*

**Примечание:** \*  $p < 0,05$  при сравнении по  $t$ -критерию с интактными животными.

**Note:** \*  $p < 0.05$  when compared by  $t$ -test with intact animals.

предохраняет массы тела от потерь, вызванных стрессовым воздействием и активизацией гипоталамо-гипофизарной оси. Курсовое введение солей лития, аскорбиновой, янтарной и оротовой кислот защищает организм от стрессорного повреждения, данные представлены в табл. 2.

Сукцинат и аскорбат лития, являясь природными макроэргами, способствуют защите организма от резкой потери энергетического баланса. Оротовая кислота, являясь негормональным анаболическим средством, оказывает общее стимулирующее действие на обменные процессы, является стимулятором синтеза нуклеиновых кислот, участвующих в синтезе белка, усиливает репаративные и регенеративные процессы в тканях. Оротовая кислота усиливает образование альбуминов в печени (особенно в условиях длительной гипоксии), повышает аппетит. Таким образом, курсовое при-

менение оротата лития способствует повышению массы тела крыс опытной группы № 6 на 16,4% и повышению среднесуточных привесов в 4,15 раза по сравнению с контрольной группой.

## Закключение

Таким образом, курсовое применение органических солей лития улучшает мотивационные характеристики поведения, внешний вид крыс, достоверно повышает ориентировочно-исследовательское поведение подопытных животных, снижает уровень тревоги, страха, неуверенности, что в целом можно охарактеризовать как адаптационно-стимулирующее влияние. При этом прослеживается тенденция накопительного действия препарата. Особенно выражен анаболический эффект оротата лития, позволяющий повысить приросты живой массы тела на фоне воздействия стрессов различной этиологии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Amdisen A. Lithium and drug interactions. *Drugs*. 1982;24(2):133–139. DOI: 10.2165/00003495-198224020-00003.
- Ostrenko K.S. Antioxidant and antistress effect of ascorbate lithium has swine in bio-medical model. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2019;2:32–35.
- Pronin A.V., Gromova O.A., Sardaryan I.S., Torshin I.Y., Stel'mashuk E.V., Aleksandrova O.P., Genrikhs E.E., Khaspekov L.G., Ostrenko K.S. The adaptogenic and neuroprotective properties of lithium ascorbate. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2018;4:409–415.
- Smith A.J., Kim S.H., Tan J., Sneed K.B., Sanberg P.R., Borlongan C.V., Shytle R.D. Plasma and Brain Pharmacokinetics of Previously Unexplored Lithium Salts. *RSC Adv*. 2014;4(24):12362–12365. DOI: 10.1039/C3RA46962J.
- Torshin I.Yu., Gromova O.A., Ostrenko K.S., Filimonova M.V., Gogoleva I.V., Demidov V.I., Kalacheva A.G. Lithium ascorbate as a promising neuro-protector: fundamental and experimental studies of an organic lithium salt. *Molecules*. 2022;27(7):2253. DOI: 10.3390/molecules27072253.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Дельцов Александр Александрович\***, д.вет.н., к.фарм.н., ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина»;  
**e-mail:** [deltsov-81@mail.ru](mailto:deltsov-81@mail.ru)

**Alexandr A. Deltsov\***, Dr. Sci. (Vet.), Cand. Sci. (Pharm.), Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K.I. Scriabin;  
**e-mail:** [deltsov-81@mail.ru](mailto:deltsov-81@mail.ru)

**Позябин Сергей Владимирович**, д.вет.н., проф., ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина»;  
**e-mail:** [rector@mgavm.ru](mailto:rector@mgavm.ru)

**Sergey V. Pozyabin**, Dr. Sci. (Vet.), Prof., Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K.I. Scriabin;  
**e-mail:** [rector@mgavm.ru](mailto:rector@mgavm.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



## РЕАКЦИЯ ЯИЧНИКОВ МЫШЕЙ НА СТИМУЛЯЦИЮ ПРЕПАРАТОМ ФСГ-СУПЕР

О.Б. Жукова, Е.М. Колоскова\*

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

Гормональная подготовка самок — доноров яйцеклеток — один из первых этапов при получении генно-модифицированных животных методом трансплантации микроинъектированных зигот. Для получения большого количества синхронизированных в развитии эмбрионов применяют процедуру суперовуляции с использованием обработки самок животных гонадотропными гормонами. Как правило, препараты от разных производителей заметно отличаются по эффективности. Введение санкционных ограничений заставляет обратить пристальное внимание на гормональные препараты российского производства, что требует их объективной оценки. Было показано, что разные партии препарата ФСГ-СУПЕР, применяющегося в основном для гормональной обработки сельскохозяйственных животных, отличались по стимулирующему воздействию на суперовуляцию у самок мышей, тем не менее превосходя по эффективности Фоллимаг («Мосагроген», Россия).

**Ключевые слова:** ФСГ-СУПЕР, гонадотропин сыворотки жеребой кобылы, хорионический гонадотропин человека, суперовуляция, яичники, мыши

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

**Для цитирования:** Жукова О.Б., Колоскова Е.М. Реакция яичников мышей на стимуляцию препаратом ФСГ-СУПЕР. *Биомедицина*. 2023;19(3E):36–42. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-36-42>

Поступила 25.04.2023

Принята после доработки 19.07.2023

Опубликована 06.11.2023

## RESPONSE OF MOUSE OVARIES TO STIMULATION WITH THE FSH-SUPER DRUG

Olga B. Zhukova, Elena M. Koloskova\*

*All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals —  
Branch of the Federal Science Center for Animal Husbandry — the All-Russian Institute  
of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst  
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institute Village*

Hormonal preparation of female egg donors is one of the first stages in obtaining genetically modified animals by microinjected zygote transplantation. A large number of embryos synchronized in development can be obtained by a superovulation procedure based on treating female animals with gonadotropins. As a rule, drugs from different manufacturers differ markedly in terms of their efficacy. In the context of sanctions imposed on the Russian Federation, attention should be paid to domestic hormonal drugs, thus substantiating their objective assessment. It was shown that different batches of the FSH-SUPER drug, used mainly for hormonal treatment of farm animals, differed in stimulating effect on superovulation in female mice. At the same time, the efficacy of this drug surpassed that of Follimag (Mosagrogen, Russia).

**Keywords:** FSH-SUPER, pregnant mare serum gonadotropin, human chorionic gonadotropin, superovulation, ovaries, mice

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

**For citation:** Zhukova O.B., Koloskova E.M. Response of Mouse Ovaries to Stimulation with the FSH-SUPER Drug. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):36–42. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-36-42>

Submitted 25.04.2023

Revised 19.07.2023

Published 06.11.2023

## Введение

Мышь — самая распространенная лабораторная модель, в т.ч. для отработки новых эмбриологических техник, протоколов и материалов. С целью получения трансгенных и нокаутных животных методом трансплантации микроинъектированных генно-инженерным материалом зигот необходимо проведение полного цикла работ, связанных с эмбриотрансфером. Гормональная подготовка самок — доноров яйцеклеток — один из самых первых и ответственных этапов. Для получения большого количества синхронизированных в развитии эмбрионов используется такая процедура, как **суперовуляция** — стимуляция роста и развития дополнительных фолликулов яичника в одном половом цикле при помощи экзогормонов. Число дополнительных овуляций за один цикл в этом случае варьирует в больших пределах и зависит от многих факторов.

Протоколы, основанные на введении гонадотропных гормонов, стандартизованы для многих видов животных, в частности мыши [4, 6, 9]. Например, для получения максимального количества яйцеклеток у самок мышей в возрасте около 4-х недель суперовуляцию индуцируют введением внутривбрюшинно 7,5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (ГСЖК) и, спустя 46–48 ч — 7,5 МЕ ХГЧ [9]. ГСЖК используется для стимуляции созревания ооцитов эндогенным фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ). Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) индуцирует овуляцию.

Основу гонадотропных препаратов составляет ФСГ. В качестве примеси к ФСГ все препараты содержат лютеинизирующий гормон (ЛГ). Это затрудняет стандартизацию препаратов и их точную дозировку. В СЖК количество ФСГ превышает ЛГ в 4–12 раз: при высоком содержании ЛГ происходит превращение фолликулов в желтые тела без предварительной овуляции. Частичная инактивация ЛГ в препарате способствует повышению оплодотворяемости и индуцированию охоты [5].

Гонадотропные препараты ветеринарного назначения получают в основном из **сыворотки крови жеребых кобыл**. Это СЖК, ГСЖК, изготовленные на их основе Фоллигон (Голландия), Фоллимаг (Россия), Синхростим 500 (Франция), Сергон (Чехия) и др. Высокие дозы этих препаратов часто являются причиной аллергических реакций, вызывают образование крупных фолликулов, множественных желтых тел, увеличение яичников в несколько раз с образованием кист. Побочные эффекты, нежелательные для длительно функционирующих сельскохозяйственных животных, приемлемы для вызывания суперовуляции у однократно используемых мышей — доноров яйцеклеток. Гипофизарные гормональные препараты не вызывают аллергических реакций. ФСГ-СУПЕР (РФ) содержит гонадотропные гормоны передней доли гипофиза свиней с соотношением 1000–1500 ед. ФСГ на 1 ед. ЛГ [5].

При использовании гипофизарных гормонов получают более стабильные и высокие результаты суперовуляции

и эмбриопродукции у коров — доноров эмбрионов по сравнению с сывороточными ФСГ. Однако из-за короткого периода полураспада (около 5 ч) препараты гипофизарного ФСГ приходится вводить многократно, тогда как период полураспада экзогенного СЖК в организме коров составляет около 6 дней, что позволяет обходиться его однократной инъекцией [2].

Ранее для процедуры суперовуляции у мышей была показана эффективность применения препаратов ГСЖК зарубежных производителей — Синхростим 500 (Франция) и Сергон (Чехия), позволяющих получить от одной мыши-донора около 25 эмбрионов, тогда как в случае Фоллимага (Россия) рабочая дозировка зачастую не определяется [6]. Наличие на рынке доступных гормональных препаратов подходящего качества — большая проблема. Партии производимых препаратов также отличаются друг от друга. Проверка качества гормонов — один из ключевых моментов процесса эмбриотрансфера. Особенно актуально это в связи с уходом зарубежных брендов и необходимостью обращаться к пока еще мало известным российским производителям биопрепаратов.

**Целью исследования** была оценка действия гормонального препарата ФСГ-СУПЕР (ООО «Агробиомед», Россия) на стимуляцию яичников мышей самок-доноров яйцеклеток, а также подбор его оптимальных концентраций.

## Материалы и методы

### *Реактивы и гормональные препараты*

ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, ФГУП «Московский эндокринный завод»; Фоллимаг (ГСЖК — гонадотропин сыворотки крови жеребых кобыл), ЗАО «Мосагроген»; ФСГ-СУПЕР партии 1 и 2 (ФСГ, выделенный из передней доли гипофиза свиней), ООО «Агробиомед» (Россия, Боровск). ФР — стерильный физ. р-р.

### *Опытные животные*

В эксперименте использовали самок мышей-гибридов С57В1/6У×СВА/У массой 18–20 г в возрасте 10–15 недель, полученных из филиала «Столовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались при световом режиме 12/12 ч, со свободным доступом к пище и воде. Было создано 8 групп мышей по 5 в каждой: 1 — интактные (ФР); 2 — отрицательный контроль (ХГЧ); 3 — ГСЖК: 4–6 — партия 1 и 7–9 — партия 2 ФСГ-СУПЕР в трех дозировках.

### *Приготовление рабочих растворов*

Содержимое флаконов всех гормонов растворяли в ФР для получения растворов следующих концентраций: ФСГ-СУПЕР (ФСГ) — 10 ЕД/мл по Арморковскому стандарту (200 МЕ/мл): ХГЧ — 100 МЕ/мл; ГСЖК — 30 МЕ/мл. Из основных растворов готовили рабочие смеси гормонов следующего состава:

Смесь 0: ФСГ 0,5 АЕ/мл (или 10 МЕ/мл), ХГЧ 20 МЕ/мл;

Смесь 1: ФСГ 1 АЕ/мл (или 20 МЕ/мл), ХГЧ 20 МЕ/мл;

Смесь 2: ФСГ 2 АЕ/мл (или 40 МЕ/мл), ХГЧ 20 МЕ/мл.

### *Обработка животных*

Животным экспериментальных групп проводили гормональную стимуляцию яичников с использованием перечисленных гонадотропных гормонов независимо от стадии эстрального цикла. Мышей опытных и контрольных групп (кроме мышей 3-й группы — СЖК) обрабатывали 5 раз: каждой мыши внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл соответствующих растворов через каждые 8 ч после первой инъекции. Мышам 1-й контрольной группы инъекцировали ФР, 2-й контрольной группы — р-р ХГЧ (4 МЕ/гол.), 3-й группы — ГСЖК (6 МЕ/гол.) (однократная инъекция). Мышам опытных групп вводили гормональные смеси 0–2 (соответственно — ФСГ в дозе 2, 4 и 8 МЕ/гол.).

Спустя двое суток после начала обработки у мышей всех исследуемых групп хирургически удаляли яичники. Яичники фотографировали, оценивали морфологически и взвешивали попарно. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета статистического анализа данных программы Microsoft Office Excel-2010. Достоверность различий оценивали по критерию *t*-Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

### Характеристика ФСГ-СУПЕР

ФСГ-СУПЕР — препарат ветеринарного назначения. Лиофилизированный порошок серовато-белого или серовато-желтого цвета. Гормональная активность препарата во флаконе — 200 или 1000 МЕ. ФСГ-СУПЕР содержит ФСГ, полученный из передней части гипофиза свиней и имеющий оптимальное для животных соотношение ФСГ к ЛГ: 1000–1500 ед. ФСГ / 1 ед. ЛГ. Препарат используется для стимуляции функции яичников у самок животных и полиовуляции у доноров эмбрионов; для регулирования полового цикла, профилактики бесплодия, повышения плодовитости; лечения различных нарушений половой сферы (гипофункции, персистентные желтые тела, ановуляторный синдром и др.); для управления половым циклом сельскохозяйственных животных — преимущественно коров и свиноматок. Например, при стимуляции коров ФСГ-СУПЕР эффективность суперовуляции составляла 90%, количество эмбрионов на одного донора было в среднем 7,8 [7]. Препарат успешно использовали в гормональных схемах для созревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* [8], для стимуляции суперовуляции у крольчих — доноров яйцеклеток при получении трансгенных кроликов [3]. Однако ранее считалось, что ФСГ не оказывает стимулирующего действия на яичники мышей.

Другие препараты из гипофизов с/х животных, применяемые (применявшиеся) в с/х

практике, — ФСГ-П (США), Фолликотропин (Чехия), Фоллитропин (Литва).

### Оценка действия ФСГ-СУПЕР на яичники мышей

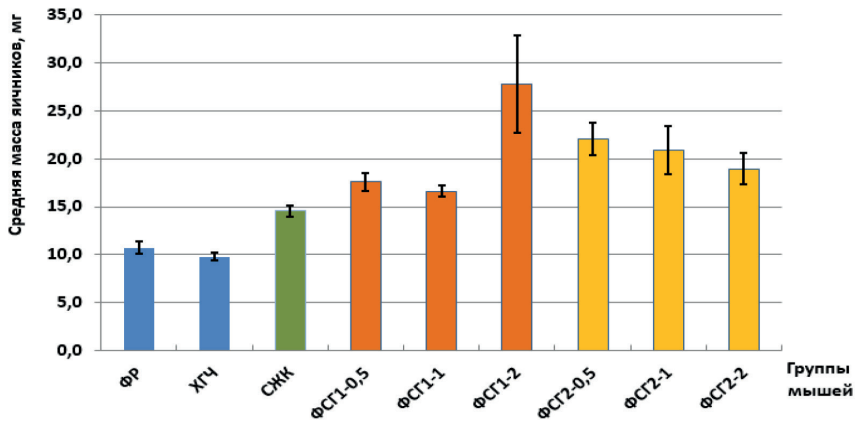
Стимуляция роста фолликулов препаратами ГСЖК сопровождается, как правило, увеличением массы яичников. Гиперстимуляция мышей ГСЖК и ХГЧ в высоких дозах по 20 МЕ уже в 1-е сут приводила к отеку и увеличению объема яичников, появлению геморрагических фолликулов [1].

В нашем эксперименте по сравнению со значениями контрольных 1-й и 2-й групп (10,7±0,6 и 9,8±0,4 мг соответственно) средняя масса яичников мышей 3-й группы (К+, СЖК) была выше на 40% (14,6±0,6), а массы яичников групп 4–9 (ФСГ-СУПЕР, партии 1 и 2 в трех дозировках) — на 55–150% в зависимости от партии и дозировки препарата, достигая максимального среднего значения 21,8±5,1 в группе ФСГ1–2 (рис. 1). Как видно из представленных фотографий (рис. 2), визуально в большинстве пар яичников мышей контрольных групп (1 и 2) наблюдали асимметрию развития левого и правого органов. В результате гормональной стимуляции суперовуляции с ростом общего объема яичников уровень асимметрии в парах снижался. На органах, находящихся в поздней фолликулярной фазе, визуально хорошо заметна развитая капиллярная система кровоснабжения, множественные зрелые фолликулы, в ряде случаев — появление геморрагических фолликулов.

Исходя из результатов, представленных на рис. 1 и 2, ФСГ-СУПЕР второй партии, несмотря на «всплеск» активности ФСГ1–2, обладает лучшей эффективностью, что подтверждается как лучшим состоянием яичников в целом, так и их большей массой при дозировках 2 и 4 МЕ/гол. по сравнению с таковыми для ФСГ1.

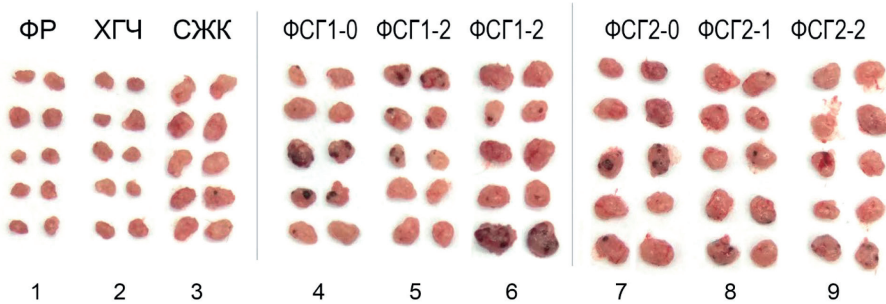
Препараты ГСЖК обладают комплексной фолликулостимулирующей и лютеинизирующей активностью. Поскольку соотношение ФСГ и ЛГ в различных партиях





**Рис. 1.** Средняя масса пар яичников мышей, обработанных ФСГ-СУПЕР, разных партий в разных дозах. Различия между контрольными (ФР и СЖК) и всеми опытными группами (включая СЖК) значимы при  $p < 0,01$ . Различия между группой СЖК и всеми ФСГ-опытными группами значимы при  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** Average a pair of ovaries mass of mice treated with FSH-SUPER in different batches at different doses. The differences between the control groups (PS and PMSG) and all experimental groups (including PMSG) are significant at  $p < 0.01$ . The differences between the PMSG group and all FSH experimental groups are significant at  $p < 0.05$ .



**Рис. 2.** Результаты воздействия гонадотропных гормонов на яичники мышей. На фото представлены пары яичников мышей всех девяти групп (по 5 мышей в каждой группе). Пояснения приведены в тексте.

**Fig. 2.** The results of the effects of gonadotropins on the ovaries of mice. The photo shows pairs of ovaries of mice from all nine groups (5 mice in each group). Explanations are given in the text.

различается, результативность суперовуляции тоже оказывается разной. То же самое можно предположить относительно гипофизарного ФСГ, препараты которого, полученные из партий сырья разного качества, даже при строгом соблюдении технологии выделения могут существенно варьировать по эффективности биологического действия.

## Закключение

От гормональной подготовки самок-доноров яйцеклеток во многом зависит эффективность получения генно-модифицированных животных методом трансплантации микроинъектированных зигот. Качество используемых гонадотропных гормонов имеет ключевое значение на этом важном этапе.

По активности биологического действия отличаются препараты не только от разных производителей, но и партии от одного и того же поставщика. По результатам наших экспериментов для стимуляции суперовуляции мышшей-доноров можно рекомендовать гипофизарный препарат ФСГ-СУПЕР от россий-

ского производителя «ООО Агробиомед», по возможности проводя предварительную экспериментальную оценку образцов разных партий: эффективность ФСГ-СУПЕР в испытанных нами дозировках (2–8 МЕ на мышшь) была достоверно выше, чем у СЖК в дозе, близкой к классической.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Айзятуллова Э.М. Экспериментальное обоснование применения терлипессина для предотвращения развития осложнений стимуляции яичников в программе вспомогательных репродуктивных технологий. *Проблемы репродукции*. 2014;(1):47–52. [Aiziatulova E.M. Eksperimental'noe obosnovanie primeneniya terlipessina dlya predotvrashcheniya razvitiya oslozhnenij stimulyatsii yaichnikov v programme vspomogatel'nykh reproduktivnykh tekhnologiy [Terlipressin use for ovarian hyperstimulation syndrome prevention in a rodent model]. *Problemy reprodukcii* [Russian J. of Human Reproduction]. 2014;(1):47–52. (In Russian)].
2. Барышева Л.С., Стрилец О.П., Стрельников Л.С. Проблемы вызывания суперовуляции в трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота. *Современные достижения фармацевтической технологии и биотехнологии. Мат-лы IV науч.-практ. конф. НФаУ*. 2014:37. [Barysheva L.S., Strilec O.P., Strel'nikov L.S. Problemy vyzyvaniya superovulyatsii v transplantatsii embrionov krupnogo rogatogo skota [The problem of superovulation survival in embryonic cattle transplantation]. *Sovremennye dostizheniya farmaceuticheskoy tekhnologii i biotekhnologii. Mat-ly IV nauch.-prakt. konf. NFAU* [Modern achievements of pharmaceutical technology and biotechnology. Materials of the IV scientific and practical conference. NPhU]. 2014:37. (In Russian)].
3. Езерский В.А., Шишиморова М.С., Тёвкин С.И., Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Безбородова О.А., Якубовская Р.И., Максименко С.В., Рябых В.П. Интеграция и тканеспецифическая экспрессия гена лактоферрина человека в молочной железе трансгенных кроликов. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2013;4:33–52. [Ezerskiy V.A., Shishimorova M.S., Tevkin S.I., Trubitsina T.P., Koloskova E.M., Bezborodova O. A., Yakubovskaya R.I., Maksimenko S.V., Ryabykh V.P. Integratsiya i tkanespecificheskaya ekspressiya gena laktoferrina cheloveka v molochnoj zheleze transgennykh krolikov [Integration and tissue-specific expression of the human lactoferrin gene in the mammary gland of transgenic rabbits]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* [Problems of Productive Animal Biology]. 2013;4:33–52. (In Russian)].
4. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., Езерский В.А., Жукова О.Б., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышшей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека. *Биомедицина*. 2016;1:52–65. [Karkishchenko V.N., Ryabykh V.P., Bolotskikh L.A., Semenov K.K., Kapandze G.D., Petrova N.V., Ezerskiy V., Zhukova O.B., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Stolyarova V.N., Trubitsina T.P. Fiziologo-embriologicheskie aspekty sozdaniya transgennykh myshey s integrirovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka [Physiological and embryological aspects of generation transgenic mice with integrated human NAT1 and NAT2 genes]. *Biomedicina* [Journal Biomed]. 2016;1:52–65. (In Russian)].
5. Мосин В.А., Дурманов Н.Д., Пустовой В.В. *Препарат для управления половым циклом животных*. Патент РФ № 2 076732. 1995. [Mosin V.A., Durmanov N.D., Pustovoy V.V. *Preparat dlya upravleniya polovym tsiklom zhivotnykh*. Патент РФ № 2 076732. 1995. (In Russian)].
6. Савченко Е.С., Огнева Н.С., Максименко С.В., Скрипкина М.М., Петрова Н.В. Оптимизация протокола гормональной обработки мышшей с целью вызывания суперовуляции. *Биомедицина*. 2020;16(3):48–53. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Maksimenko S.V., Skripkina M.M., Petrova N.V. Optimizatsiya protokola gormonal'noj obrabotki myshey s cel'yu vyzyvaniya superovulyatsii [Optimizing the Hormonal Mice Treatment Protocol to Induce Superovulation]. *Biomedicina* [Journal Biomed]. 2020;16(3):48–53. (In Russian)].
7. Сеин О.Б., Сеин Д.О., Дураков В.А., Оленина Н.В. *Способ получения препарата фолликулостимулирующего гормона из гипофизов животных*. Патент РФ № 2 657 765С1. 2016. [Sein O.B., Sein D.O., Churakov V.A., Olenina N.V. *Sposob polucheniya preparata follikulostimuliruyushchego gormona*

*iz gipofizov zhivotnyh* [A method for obtaining a follicle-stimulating hormone preparation from the pituitary glands of animals]. Patent RF No. 2 657 76. 2016. (In Russian)].

8. Сметанина И.Г., Кривохарченко А.С. Исследования по разработке культуральных систем для созревания ооцитов крупного рогатого скота в условиях *in vitro*: состояние и перспективы. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2017;1:28–53. [Smetanina I.G., Krivokharchenko A.S. Issledovaniya

po razrabotke kul'tural'nyh sistem dlya sozrevaniya oocitov krupnogo rogatogo skota v usloviyah *in vitro*: sostoyanie i perspektivy [Research on the development of culture systems for the maturation of cattle oocytes in *in vitro* conditions: state and prospects]. *Problemy biologii produktivnyh zhivotnyh* [Problems of Productive Animal Biology]. 2017;1:28–53. (In Russian)].

9. Хедерингтон К. Разведение мышей. В кн.: *Биология развития млекопитающих. Методы*. Пер.

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Жукова Ольга Борисовна**, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;  
**e-mail:** [olgazhukova19801031@gmail.ru](mailto:olgazhukova19801031@gmail.ru)

**Olga B. Zhukova**, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals — Branch of the Federal Science Center for Animal Husbandry — the All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;

**e-mail:** [olgazhukova19801031@gmail.com](mailto:olgazhukova19801031@gmail.com)

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

**Elena M. Koloskova\***, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals — Branch of the Federal Science Center for Animal Husbandry — the All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;

**e-mail:** [heleko3@yandex.ru](mailto:heleko3@yandex.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ИДЕНТИФИКАЦИИ N-КОНЦЕВЫХ АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗ БАКТЕРИЙ И ВЕРИФИКАЦИЯ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Т.А. Кудряшов\*, М.В. Трунилина, В.В. Быков, И.С. Болдаевский,  
А.С. Соколов, Ю.С. Лаптева

Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ  
«Пушчинский научный центр биологических исследований» РАН  
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушино, просп. Науки, 3

N-концевые ацетилтрансферазы (NAT) бактерий ацетируют  $\alpha$ -аминогруппу в аминокислотах и белках, участвуют в биосинтезе лантибиотиков и инактивации ряда антибиотиков. NAT находят применение в биотехнологии для направленного ацетилирования рекомбинантных белков и пептидов. В этой связи актуален поиск NAT, отличающихся по субстратной специфичности, а также способных функционировать в реакции при высоких температурах, широком диапазоне pH и др. Мы разработали специфические характеристики и алгоритм поиска для идентификации N-концевых ацетилтрансфераз на примере термофильной бактерии *Thermus thermophilus*. Из 14 аннотированных в геноме AT мы отобрали шесть «предполагаемых» NAT. Часть генов, кодирующих отображенные NAT, были успешно клонированы, наработаны и очищены из клеток *E. coli*. Была подтверждена специфическая ферментативная активность ряда ферментов.

**Ключевые слова:** N-концевое ацетилирование, GNAT-фолд, антибиотики, метионин сульфоксимин, *Thermus thermophilus*

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

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00478.

**Для цитирования:** Кудряшов Т.А., Трунилина М.В., Быков В.В., Болдаевский И.С., Соколов А.С., Лаптева Ю.С. Разработка алгоритма идентификации N-концевых ацетилтрансфераз бактерий и верификация их функциональной активности. *Биомедицина*. 2023;19(3E):43–46. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-43-46>

Поступила 20.04.2023

Принята после доработки 16.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## DEVELOPMENT OF AN ALGORITHM FOR IDENTIFICATION OF N-TERMINAL ACETYLTRANSFERASES AND VERIFICATION OF THEIR FUNCTIONAL ACTIVITY

Timofey A. Kudryashov\*, Maria V. Trunilina, Vyacheslav V. Bykov,  
Igor S. Boldaevsky, Andrey S. Sokolov, Yulia S. Lapteva

Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research  
of the Russian Academy of Sciences  
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3

N-terminal acetyltransferases (NATs) of bacteria acetylate the alpha-amino group in amino acids and proteins, participate in the biosynthesis of lantibiotics, and inactivate a number of antibiotics. NATs are used in biotechnology for targeted acetylation of recombinant proteins and peptides. In this regard, the search for NATs that differ in terms of substrate specificity and are also capable of functioning in the reaction at elevated temperatures, a wide pH range, etc., seems relevant. In this work, we develop specific characteristics and a search algorithm for the identification of N-terminal acetyltransferases using the *Thermus thermophilus* thermophilic bacterium as an example. Out of 14 Abs annotated in the genome, we selected six «putative» NATs. Some of the genes encoding the selected NATs were successfully cloned, generated, and purified from *E. coli* cells. The specific enzymatic activity of a number of enzymes was confirmed.

**Keywords:** N-terminal acetylation, GNAT-fold, microcin C, methionine sulfoximine, *Thermus thermophilus*

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

**Funding:** the research was supported by a grant from the Russian Science Foundation, No. 23-24-00478.

**For citation:** Kudryashov T.A., Trunilina M.V., Bykov V.V., Boldaevsky I.S., Sokolov A.S., Lapteva Yu.S. Development of an Algorithm for Identification of N-terminal Acetyltransferases and Verification of Their Functional Activity. *Биомедицина*. 2023;19(3E):43–46. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-43-46>

Submitted 20.04.2023

Revised 16.05.2023

Published 06.11.2023

Ацетилирование играет важную регуляторную роль в поддержании метаболизма бактерий. N-ацетилтрансферазы (АТ) многочисленного (свыше 10 тыс. представителей) GNAT-суперсемейства бактерий ацетируют широкий круг субстратов: аминокислоты, витамины, антибиотики, полиамины, тРНК, белки, пептиды, структурные компоненты клеточных стенок и др. [1]. Среди АТ особый интерес представляют N-концевые АТ (NAT). NAT избирательно ацетируют α-аминогруппу в аминокислотах и белках, участвуют в синтезе/инактивации ряда антибиотиков [3, 7, 8]. NAT находят применение в биотехнологии для направленного ацетилирования рекомбинантных белков и пептидов [2, 4], а также рассматриваются в качестве мишеней для решения проблемы антибиотикорезистентности бактерий [5, 9]. АТ обладают низким процентом идентичности аминокислотных последовательностей, но высоким сродством третичных структур. В связи с этим классификация ферментов осуществляется в основном на основании предполагаемой укладки элементов вторичных структур (GNAT-фолд). Геномы бактерий содержат от 26 до 72 открытых рамок

считывания (ОПС) N-ацетилтрансфераз. Среди них на основании лишь аминокислотной последовательности сложно определить, является ли интересующий нас белок N-концевой АТ, полиамин-АТ или лизин-АТ. В этой связи актуальна разработка специфических характеристик и алгоритма поиска ферментов для каждой подгруппы АТ.

**Целью** данной работы является идентификация новых NAT и подтверждение их функциональной активности. В качестве модельного организма была выбрана гипертермофильная бактерия *Thermus thermophilus*. С использованием методов биоинформатики проведен анализ генома *T. thermophilus* HB8 и отобраны 14 аннотированных ацетилтрансфераз. Проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей отобранных АТ с известными белками-ортологами из бактерий *E. coli* и *Salmonella* spp. При помощи сервера BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) аминокислотные последовательности АТ исследованы на наличие в них консервативного аминокислотного мотива «(Q/R)-X-X-G-X-(G/A)», ответственного за связывание ацетил-кофермен-

та А. При помощи программы PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) и JPRED4 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>) проведено предсказание элементов вторичных структур на основе последовательности аминокислот каждой из АТ. Проведен анализ предсказанных структур NAT на их соответствие специфическому чередованию элементов вторичных структур «GNAT-fold».

В результате биоинформатического анализа нами были отобраны шесть предполагаемых NAT. Мы установили, что предполагаемые NAT имеют длину от 150 до 200 аминокислот, содержат вырожденный консенсус «(Q/R)-X-X-G-X-(G/A)» и консервативный «GNAT-fold». С целью подтверждения функциональной активности предполагаемых NAT гены, кодирующие эти ферменты (ТТНА\_0176, ТТНА\_0282, ТТНА\_0790, ТТНА\_1209 и ТТНА\_1799), были клонированы в экспрессионные вектора. В настоящее время проведена работа и очистка двух рекомбинантных NAT (ТТНА\_1799 и ТТНА\_1209) в клетках *E. coli*. Для подтверждения N-концевой ацетилтрансферазной активности проводили реакцию ацетилирования *in vitro*, где в качестве донора ацетильной группы выступал ацетил-кофермент А, в качестве акцептора — рекомбинантный парвальбумин крысы. Методом масс-спектрометрии

установлено, что ферменты ТТНА\_1209 и ТТНА\_1799 ацетируют парвальбумин с эффективностью 20 и 80% соответственно. Ацетилирование N-концевой альфа-аминогруппы (а не  $\epsilon$ -аминогрупп лизина) подтверждали при помощи реакции с флюоресцентным реактивом NBD-Cl, который избирательно реагирует со свободной  $\alpha$ -аминогруппой. Биоинформатический анализ фермента ТТНА\_1209 позволил отнести его к группе ферментов, ацетилирующих  $\alpha$ -аминогруппы метионина и его производных метионин сульфоксимины (MSX) и метионин сульфона (MSO) [6]. Активность ТТНА\_1209 в отношении MSX подтверждали в реакции с DTNB, который взаимодействует со свободными сульфгидрильными группами кофермента А, образующимися после ферментативного отщепления ацетильной группы ацетилтрансферазой и переноса ее на MSX.

Таким образом, нами сформулированы параметры, характерные для N-концевых АТ. Разработан алгоритм поиска, позволяющий идентифицировать N-концевые АТ. Подтверждена специфическая функциональная активность идентифицированных N-концевых АТ. Результаты исследования важны для систематики и классификации ферментов суперсемейства GNAT-ацетилтрансфераз, а также для понимания молекулярных основ их субстратной специфичности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Burckhardt R.M., Escalante-Semerena J.C. Small-Molecule Acetylation by GCN5-Related N-Acetyltransferases in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020;15;84(2):e00090-19. DOI: 10.1128/MMBR.00090-19.
2. Chen J., et al. Production of N(alpha)-acetyl Talpha1-HSA through *in vitro* acetylation by RimJ. *Oncotarget.* 2017;8(56):95247–95255.
3. Deng S., Marmorstein R. Protein N-Terminal Acetylation: Structural Basis, Mechanism, Versatility, and Regulation. *Trends Biochem. Sci.* 2021;46(1):15–27.
4. Esipov R.S., et al. Development of the intein-mediated method for production of recombinant thymosin beta4 from the acetylated *in vivo* fusion protein. *J. Biotechnol.* 2016;228:73–81.
5. Hentchel K.L., Escalante-Semerena J.C. Acylation of Biomolecules in Prokaryotes: a Widespread Strategy for the Control of Biological Function and Metabolic Stress. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015;79(3):321–346.
6. Hentchel K.L., Escalante-Semerena J.C. In *Salmonella enterica*, the Gcn5-related acetyltransferase MddA (formerly YncA) acetylates methionine sulfoximine

- and methionine sulfone, blocking their toxic effects. *J. Bacteriol.* 2015;197(2):314–325.
7. Huang E., Yousef A.E. Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*. *Microbiol. Res.* 2015;181:15–21.
  8. Kazakov T., et al. The RimL transacetylase provides resistance to translation inhibitor microcin C. *J. Bacteriology.* 2014;196(19):3377–3385.
  9. Ren J., et al. Protein Acetylation and Its Role in Bacterial Virulence. *Trends Microbiol.* 2017;25(9):768–779.

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Кудряшов Тимофей Андреевич\***, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

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

**Timofey A. Kudryashov\***, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

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

**Трунилина Мария Викторовна**, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

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

**Maria V. Trunilina**, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

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

**Быков Вячеслав Владимирович**, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

**e-mail:** [naggilan88@gmail.com](mailto:naggilan88@gmail.com)

**Vyacheslav V. Bykov**, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [naggilan88@gmail.com](mailto:naggilan88@gmail.com)

**Болдаевский Игорь Сергеевич**, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

**e-mail:** [i13boldaevsky@gmail.com](mailto:i13boldaevsky@gmail.com)

**Igor S. Boldaevsky**, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [i13boldaevsky@gmail.com](mailto:i13boldaevsky@gmail.com)

**Соколов Андрей Сергеевич**, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

**e-mail:** [212sok@gmail.com](mailto:212sok@gmail.com)

**Andrey S. Sokolov**, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [212sok@gmail.com](mailto:212sok@gmail.com)

**Лаптева Юлия Сергеевна**, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;

**e-mail:** [yulia.s.lapteva@gmail.com](mailto:yulia.s.lapteva@gmail.com)

**Yulia S. Lapteva**, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [yulia.s.lapteva@gmail.com](mailto:yulia.s.lapteva@gmail.com)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ПОЛУЧЕНИЕ СВЕРХСТАБИЛЬНОЙ МЕТИОНИНАМИНОПЕПТИДАЗЫ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ МЕТИОНИНА ИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Ю.С. Лаптева, В.В. Быков, М.В. Трунилина, И.С. Болдаевский, Т.А. Кудряшов\*,  
А.А. Вологжанникова, А.С. Соколов

Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ  
«Пушчинский научный центр биологических исследований» РАН  
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3

Отщепление N-концевого иницирующего метионина (Met1) является критически значимой ко- и посттрансляционной модификацией, затрагивающей 50–70% клеточных белков. При наработке рекомбинантных белков в гетерологичной системе экспрессии *E. coli* отщепление Met1 часто не происходит, что приводит к гетерогенности получаемых препаратов, изменению их активности и стабильности. Решают эту проблему обработкой рекомбинантных белков *in vitro* специфическим ферментом — метионинаминопептидазой (МАП). Имеющиеся в настоящее время МАП обладают ограниченными специфичностями и условиями проведения реакций. Нами клонирована МАП из гипертермофильной бактерии, разработана методика очистки фермента, исследован ряд физико-химических свойств. Новый фермент МАП обладает устойчивостью к высоким температурам. МАП сохраняет стабильное нативное состояние в диапазоне pH от 3 до 11 единиц. Новый фермент МАП может быть использован для удаления N-концевого Met1 из рекомбинантных белков *in vitro* в широком диапазоне pH и в условиях повышенных температур.

**Ключевые слова:** метионинаминопептидаза, *Thermus thermophilus*, гетерологичная экспрессия, удаление N-концевого метионина

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

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00563.

**Для цитирования:** Лаптева Ю.С., Быков В.В., Трунилина М.В., Болдаевский И.С., Кудряшов Т.А., Вологжанникова А.А., Соколов А.С. Получение сверхстабильной метионинаминопептидазы для удаления метионина из рекомбинантных белков. *Биомедицина*. 2023;19(3E):47–51. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-47-51>

Поступила 20.04.2023

Принята после доработки 16.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## OBTAINING OVERSTABLE METHIONINE AMINOPEPTIDASE FOR THE REMOVAL OF METHIONINE FROM RECOMBINANT PROTEINS

Yulia S. Lapteva, Vyacheslav V. Bykov, Maria V. Trunilina, Igor S. Boldaevsky,  
Timofey A. Kudryashov\*, Alisa A. Vologzhannikova, Andrey S. Sokolov

Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research  
of the Russian Academy of Sciences  
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3



Cleavage of the N-terminal initiating methionine (Met1) is a critical co- and post-translational modification affecting 50–70% of cellular proteins. During the production of recombinant proteins in the heterologous system of *E. coli* expression, Met1 cleavage often fails to occur, which leads to heterogeneity of the preparations obtained, changes in their activity and stability. This problem can be solved by treating recombinant proteins *in vitro* with a specific enzyme, methionine aminopeptidase (MAP). Currently available MAPs exhibit limited specificities and reaction conditions. We cloned a MAP from a hyperthermophilic bacterium, developed a method for enzyme purification, and studied a number of physicochemical properties. The new MAP enzyme is resistant to elevated temperatures. The MAP maintains a stable native state in a pH range from 3 to 11 units. The novel MAP enzyme can be used to remove N-terminal Met1 from recombinant proteins *in vitro* over a wide pH range and at elevated temperatures.

**Keywords:** methionine aminopeptidase, *Thermus thermophilus*, heterologous expression, N-terminal methionine excision

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

**Funding:** the research was supported by a grant from the Russian Science Foundation, No. 23-24-00563.

**For citation:** Lapteva Yu.S., Bykov V.V., Trunilina M.V., Boldaevsky I.S., Kudryashov T.A., Vologzhanikova A.A., Sokolov A.S. Obtaining Overstable Methionine Aminopeptidase for the Removal of Methionine From Recombinant Proteins. *Биомедицина*. 2023;19(3E):47–51. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-47-51>

Submitted 20.04.2023

Revised 16.05.2023

Published 06.11.2023

## Введение

Биосинтез полипептидной цепи в клетках начинается с иницирующего метионина (Met1), который затем удаляется специфическим ферментом клеток — метионинаминопептидазой (МАП). Удаление Met1 является крайне консервативной и критически значимой ко- и посттрансляционной модификацией, затрагивающей 50–70% клеточных белков [6]. Модификация необходима для правильной субклеточной локализации белков [9], осуществляет контроль продолжительности жизни белков [7], предшествует другим посттрансляционным модификациям [3, 4]. При сверхэкспрессии рекомбинантных белков в *E. coli* отщепление Met1 либо совсем не происходит, либо происходит частично. В результате получают препараты смеси белков с Met1 и без него. При сравнении двух форм рекомбинантного рибосомального белка S6 *T. thermophilus* (с N-концевым Met1 и без него) были показаны существенные различия в структурных свойствах белка и его конформационной стабильности [11]. Две формы

человеческого сывороточного амилоида А отличаются по способу фибриллообразования и патогенеза [10]. Отщепление Met1 критично для ферментативной активности и цитотоксичности онконазы [8], а также необходимо для ряда биотехнологически значимых белков — гемоглобина человека [1], интерлейкина-2 [5], интерлейкина-36 альфа, гормона роста, рибонуклеаз лягушки и человека [2]. Поскольку удаление Met1 из рекомбинантного белка часто имеет решающее значение в поддержании его стабильности и функции, проводят либо коэкспрессию целевых белков с МАП из разных организмов, либо обработку рекомбинантных белков МАП *in vitro*. Имеющиеся в настоящее время коммерчески доступные МАП *E. coli* и человека обладают ограниченной субстратной специфичностью и условиями проведения реакций (температура и pH оптимум) *in vitro*. В этой связи актуален поиск новых МАП, особенно способных работать в условиях повышенных температур и широкого диапазона pH.

**Целью** данной **работы** является изучение тепловой и рН стабильности метионинаминопептидазы из гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus*.

## Материалы и методы

Ген (GenBank: TTH\_RS08450) метионинаминопептидазы *Thermus thermophilus* HB8 (ВКМ В-1605) клонирован в вектор под контроль гибридного T7lac промотора. Рекомбинантный фермент МАП нарабатывали в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3). Очистку фермента проводили при помощи металл-хелатной, ионнообменной и эксклюзионной хроматографии. Гомогенность препарата оценивали при помощи электрофореза в 15% ПААГ и методом масс-спектрометрии. С использованием метода собственной флуоресценции белка исследовали тепловую стабильность и рН-стабильность фермента. Поскольку МАП является кобальт-зависимой протеазой, проводилось исследование двух форм белков: апоформы (без металла) и кобальт-связанной формы (0,1 мМ  $\text{Co}^{2+}$ ).

## Результаты и их обсуждение

Ген МАП успешно амплифицирован нами из геномной ДНК *Thermus thermophilus* HB8 и клонирован в вектор рНUE. При индукции экспрессии МАП в клетках *E. coli* наблюдается наработка белка, соответствующего расчетной молекулярной массе фермента. Нами разработана методика очистки фермента, позволяющая получать его в гомогенном состоянии. При этом вы-

ход фермента составляет примерно 20 мг/Л культуры. Фермент МАП содержит четыре остатка триптофана и шесть остатков тирозина, что позволяет использовать метод собственной флуоресценции белка для изучения конформационных переходов в белке. С использованием этого метода провели исследование изменения конформации фермента при его нагревании от 20 до 98°C в буфере 50 мМ Hepes рН=7,5, 150 мМ KCl, 14 мкМ DTT. Нами показано, что середина теплового перехода белка из нативного в денатурированное состояние составляет 65°C для апоформы и 79°C — для кобальт-связанной формы. Это свидетельствует о том, что термостабильность фермента в апоформе составляет 65°C, а связывание ферментом ионов кобальта приводит к увеличению его термостабильности до 79°C. Методом собственной флуоресценции нами также исследована стабильность фермента в диапазоне рН 2–12. Нами установлено, что фермент сохраняет свою конформационную стабильность при рН от 3 до 11 единиц как в апоформе, так и в кобальт-связанном состоянии.

## Выводы

Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что новый фермент МАП из гипертермофильной бактерии *Thermus thermophilus* может применяться в биотехнологии для удаления N-концевого иницирующего метионина из рекомбинантных белков *in vitro* в условиях высоких температур и в широком диапазоне рН среды.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Adachi K., et al. Expression of functional soluble human alpha-globin chains of hemoglobin in bacteria. *Protein Expr. Purif.* 2000;20(1):37–44.
2. Boix E., et al. Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *J. Mol. Biol.* 1996;257(5):992–1007.
3. Bradshaw R.A., Brickey W.W., Walker K.W. N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. *Trends Biochem. Sci.* 1998;23(7):263–267.
4. Chen L., Kashina A. Post-translational Modifications of the Protein Termini. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:719590.
5. Endo S., et al. The additional methionine residue at the N-terminus of bacterially expressed human inter-

- leukin-2 affects the interaction between the N- and C-termini. *Biochemistry*. 2001;40(4):914–919.
6. Giglione C., Boularot A., Meinnel T. Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol. Life Sci*. 2004;61(12):1455–1474.
  7. Giglione C., Vallon O., Meinnel T. Control of protein life-span by N-terminal methionine excision. *EMBO J*. 2003;22(1):13–23.
  8. Liao Y.D., et al. The structural integrity exerted by N-terminal pyroglutamate is crucial for the cytotoxicity of frog ribonuclease from *Rana pipiens*. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(18):5247–5255.
  9. Meinnel T., Mechulam Y., Blanquet S. Methionine as translation start signal: a review of the enzymes of the pathway in *Escherichia coli*. *Biochimie*. 1993;75(12):1061–1075.
  10. Patke S., et al. Characterization of the oligomerization and aggregation of human Serum Amyloid A. *PLoS One*. 2013;8(6):e64974.
  11. Uversky V.N., et al. Structure and stability of recombinant protein depend on the extra N-terminal methionine residue: S6 permutin from direct and fusion expression systems. *Biochem. Biophys. Acta*. 1999;1432(2):324–332.

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Лаптева Юлия Сергеевна**, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

**e-mail:** [yulia.s.lapteva@gmail.com](mailto:yulia.s.lapteva@gmail.com)

**Быков Вячеслав Владимирович**, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

**e-mail:** [naggilan88@gmail.com](mailto:naggilan88@gmail.com)

**Трунилина Мария Викторовна**, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

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

**Болдаевский Игорь Сергеевич**, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

**e-mail:** [i13boldaevsky@gmail.com](mailto:i13boldaevsky@gmail.com)

**Кудряшов Тимофей Андреевич\***, Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

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

**Yulia S. Lapteva**, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [yulia.s.lapteva@gmail.com](mailto:yulia.s.lapteva@gmail.com)

**Vyacheslav V. Bykov**, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [naggilan88@gmail.com](mailto:naggilan88@gmail.com)

**Maria V. Trunilina**, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

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

**Igor S. Boldaevsky**, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

**e-mail:** [i13boldaevsky@gmail.com](mailto:i13boldaevsky@gmail.com)

**Timofey A. Kudryashov\***, Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

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

**Вологжанникова Алиса Андреевна**, к.б.н.,  
Институт биологического приборостроения  
ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;  
e-mail: [lisiks.av@gmail.com](mailto:lisiks.av@gmail.com)

**Alisa A. Vologzhannikova**, Cand. Sci. (Biol.),  
Institute for Biological Instrumentation, Pushchino  
Scientific Center for Biological Research of the  
Russian Academy of Sciences;  
e-mail: [lisiks.av@gmail.com](mailto:lisiks.av@gmail.com)

**Соколов Андрей Сергеевич**, к.б.н., Институт  
биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ  
«Пушинский научный центр биологических исследований» РАН;  
e-mail: [212sok@gmail.com](mailto:212sok@gmail.com)

**Andrey S. Sokolov**, Cand. Sci. (Biol.), Institute  
for Biological Instrumentation of the Pushchino  
Scientific Center for Biological Research of the  
Russian Academy of Sciences;  
e-mail: [212sok@gmail.com](mailto:212sok@gmail.com)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



## СОЗДАНИЕ МЕТОДОМ 3D-ПЕЧАТИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

С.А. Мачулин\*, Т.А. Астрелина, Д.Ю. Усупжанова, А.О. Завьялов, Т.Ф. Маливанова,  
А.И. Головкова, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова, В.А. Брунчуков, А.А. Расторгуева,  
В.А. Никитина, Е.Е. Ломоносова, О.Г. Михадаркина, А.С. Самойлов

ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации —  
Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России  
123182, Российская Федерация, Москва, ул. Живописная, 46

В данной статье описан процесс разработки тканеинженерной конструкции, отвечающей необходимым для замещения дефектов хрящевой ткани параметрам биосовместимости и биodeградации. Представленное исследование выполнено с использованием технологии 3D-биопринтинга, являющейся на данный момент одним из наиболее исследуемых направлений в медицине. Хрящевая ткань, как известно, не способна к полноценной регенерации возникающих повреждений из-за особенностей своего строения. Применяемые на сегодня методы лечения артрозов имеют ряд ограничений и недостатков, вследствие чего исследования, направленные на разработку альтернативных методов лечения артрозов, приобретают всё большую актуальность. Для создания тканеинженерных конструкций методом 3D-биопечати используются материалы, сертифицированные для использования в медицинских целях, а также обладающие свойствами биосовместимости и биodeградации. В частности, полилактид (PLA) и альгинат натрия удовлетворяют вышеописанным требованиям, а кроме того, их экономическая доступность и распространённость делает их одними из самых популярных материалов для 3D-биопечати.

**Ключевые слова:** 3D-биопечать, альгинат, полилактид, тканеинженерная конструкция, дефекты хрящевой ткани

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

**Для цитирования:** Мачулин С.А., Астрелина Т.А., Усупжанова Д.Ю., Завьялов А.О., Маливанова Т.Ф., Головкова А.И., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Брунчуков В.А., Расторгуева А.А., Никитина В.А., Ломоносова Е.Е., Михадаркина О.Г., Самойлов А.С. Создание методом 3D-печати тканеинженерной конструкции, предназначенной для замещения дефектов хрящевой ткани. *Биомедицина*. 2023;19(3E):52–58. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-52-58>

Поступила 28.04.2023

Принята после доработки 20.07.2023

Опубликована 06.11.2023

## 3D PRINTING OF A TISSUE-ENGINEERED STRUCTURE INTENDED TO REPLACE CARTILAGE DEFECTS

Semen A. Machulin\*, Tatiana A. Astrelina, Daria Yu. Usupzhanova, Anton O. Zavialov,  
Tatiana F. Malivanova, Anastasia I. Golovkova, Irina V. Kobzeva, Yulia B. Suchkova,  
Vitaliy A. Brunchukov, Anna A. Rastorgueva, Viktoria A. Nikitina, Elena E. Lomonosova,  
Olga G. Mihadarkina, Alexandr S. Samoilov

State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named  
after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia  
123182, Russian Federation, Moscow, Zhivopisnaya Str., 46

This article describes the process of developing a tissue-engineered structure that meets the biocompatibility and biodegradation parameters necessary for replacing cartilage tissue defects. The study was carried out using 3D bioprinting technology, which represents a promising research direction in the biomedical field. It is known that, due to the specifics of its structure, cartilage tissue is not capable of complete regeneration of damage. The methods currently used for treating arthrosis are associated with a number of limitations and disadvantages, which makes research aimed at developing alternative methods for arthrosis treatment particularly relevant. The development of tissue-engineered structures by 3D bioprinting requires the materials not only certified for medical use but also exhibiting biocompatibility and biodegradation properties. Polylactide (PLA) and sodium alginate satisfy the above requirements; moreover, their availability and economic affordability make them one of the most popular materials for 3D bioprinting.

**Keywords:** 3D bioprinting, alginate, polylactide, tissue-engineered structure, cartilage tissue defects

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

**For citation:** Machulin S.A., Astrelina T.A., Usupzhanova D.Yu., Zavalov A.O., Malivanova T.F., Golovkova A.I., Kobzeva I.V., Suchkova Yu.B., Brunchukov V.A., Rastorgueva A.A., Nikitina V.A., Lomonosova E.E., Mihadarkina O.G., Samoilov A.S. 3D Printing of a Tissue-Engineered Structure Intended to Replace Cartilage Defects. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):52–58. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-52-58>

Submitted 28.04.2023

Revised 20.07.2023

Published 06.11.2023

## Введение

В последнее время технология 3D-печати получает всё большее распространение в медицине [2]. Внедрение данного метода позволяет упростить многие процедуры и расширить спектр оказываемых услуг. Одним из самых популярных исследуемых направлений 3D-биопечати является регенерация повреждённых тканей человека, среди которых особое внимание уделяется костной и хрящевой тканям [4]. Из-за своего строения и состава хрящевая ткань неспособна в полной мере регенерировать возникающие паталогические изменения, что со временем приводит к развитию артрозов, в частности коленных и тазобедренных суставов, и, как следствие, снижению качества жизни человека. Одним из решений данной проблемы является замещение дефектов хрящевой ткани. Недавние исследования показали возможность использование технологии 3D-биопечати для создания тканеинженерных конструкций, подобных хрящевой ткани, с использованием комбинации биочернил [5]. В частности, поли-

лактид (PLA) и альгинат натрия обладают такими важными свойствами, как биосовместимость и биodeградация, а изделие, полученное на их основе, выдерживает нагрузки, сравнимые с нагрузками на суставной хрящ здорового человека [1]. Оба материала одобрены для использования в медицинских целях, а доступность и относительная дешевизна делает их одними из самых популярных материалов для 3D-биопечати. Основными препятствиями для применения 3D-печати в области медицины является отсутствие единых протоколов печати и большое разнообразие производителей 3D-принтеров с различным набором функций [3]. Совокупность данных факторов требует индивидуального подбора параметров печати для каждого конкретного принтера и различных задач.

**Целью** данной работы явилась разработка протокола создания тканеинженерной конструкции на основе PLA и альгината натрия методом 3D-печати для замещения дефектов хрящевой ткани.

## Материалы и методы

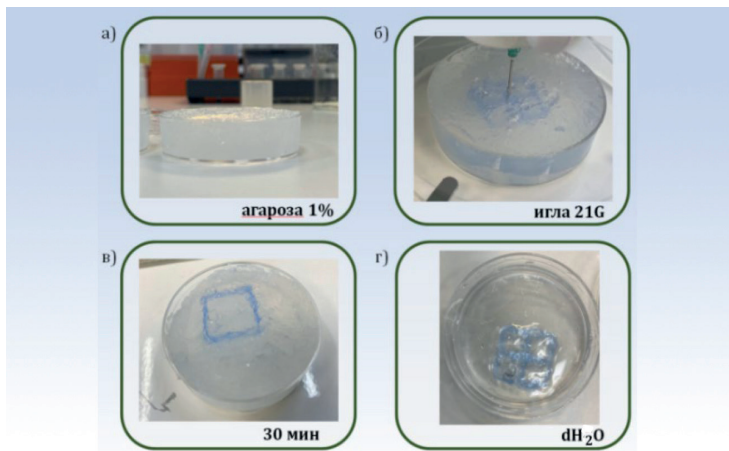
В работе были использованы 3D-биопринтер Dr. Invivo 4D (“Rokit Healthcare”, Корея), программное обеспечение New Creator K (“Rokit Healthcare”, Корея), программное обеспечение Blender (“Blender Foundation”, Нидерланды), препарат альгината (“Cellink”, Швеция), агароза (“VWR Amresco”, США), PLA (“REC”, Россия), р-р  $\text{CaCl}_2$  (“ХимМед”, Россия), р-р Coomassie brilliant blue (“Servicebio”, Китай).

## Результаты исследований

Тканеинженерная конструкция была смоделирована исходя из необходимости в ее механической прочности и создания благоприятной среды для заселения клетками-резидентами (рис. 1). PLA обладает достаточной механической прочностью и способен выдерживать нагрузки, сравнимые с нагрузками в суставных хрящах здорового человека. В свою очередь, альгинат

натрия способен обеспечивать подходящую среду для выживания и нормальной жизнедеятельности клеток, в т.ч. мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и хондроцитов.

На первом этапе работы была отработана 3D-печать каждым используемым материалом в отдельности. При 3D-печати PLA были отрегулированы такие параметры, как ретракция (обратное всасывание материала), скорость печати, а также процент заполнения модели. 3D-печать альгинатом натрия отработывалась с использованием метода печати в поддерживающей суспензии из агарозы различной концентрации — 1, 1,5 и 2%. Полимеризация альгината натрия достигалась за счёт добавления в поддерживающую суспензию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в составе  $\text{CaCl}_2$  до конечной концентрации 0,11% (рис. 1). Наилучшим образом печать альгинатом натрия осуществлялась в 1% суспензии агарозы. По итогам данного этапа были настроены такие параметры,

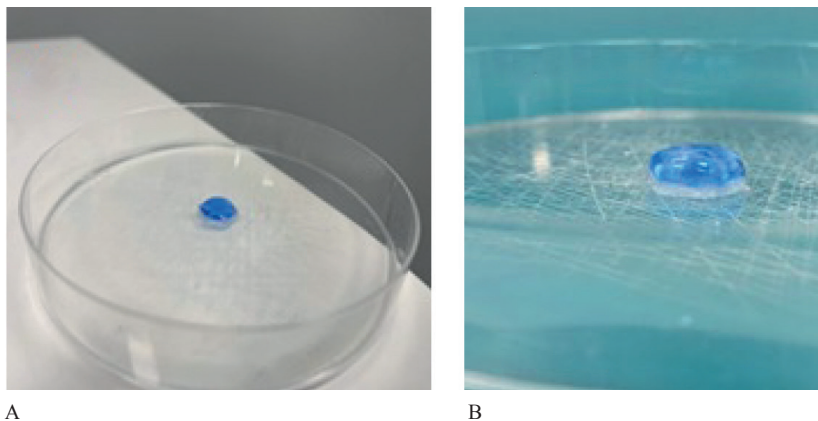


**Рис. 1.** Метод CLASS:

- а) 1% поддерживающая суспензия из агарозы;
- б) процесс печати альгинатом натрия в поддерживающей суспензии иглой 21G;
- в) полимеризация модели 30 мин при комнатной температуре;
- г) извлечение модели путём растворения агарозы в воде.

**Fig. 1.** CLASS method:

- a) 1% agarose slurry;
- b) 3D-printing with sodium alginate using support medium with needle 21G;
- c) model polymerization at room temperature for 30 min;
- d) model extraction by agarose dissolution in  $\text{H}_2\text{O}$ .



**Рис. 2.** Тканеинженерная конструкция после печати:  
А) до полимеризации;  
В) после полимеризации.

**Fig. 2.** Tissue-engineering constructions after printing:  
А) before polymerization;  
В) after polymerization.

как ретракция, input flow (количество материала, которое выдётся за единицу времени) и толщина слоя.

Запуск 3D-биопечати тканеинженерной конструкции осуществлялся с учётом значений параметров, отработанных на первом этапе работы. Поскольку конструкция из PLA обеспечивает поддержание формы 3D-модели, поддерживающая суспензия из агарозы не использовалась. Для достижения полимеризации альгината натрия напечатанная конструкция помещалась в 0,11% р-р  $\text{CaCl}_2$  на 30 мин (рис. 2). Важно, что 3D-биопринтер ROKIT Dr.Invivo 4D позволяет одновременно использовать два типа чернил при печати одной модели, од-

нако имеется ограничение в виде строгого соблюдения послойности печати независимо от материала. Это наложило некоторые ограничения на обрабатываемый протокол, которые были успешно скорректированы внесением изменений в 3D-модель разрабатываемой конструкции, а также в параметры печати, такие как input flow и diameter.

## Выводы

Таким образом, с учётом особенностей задаваемых параметров 3D-биопечати PLA и альгината натрия был разработан протокол создания тканеинженерной конструкции для замещения дефектов хрящевой ткани.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Antich C., de Vicente J., Jiménez G., et al. Bio-inspired hydrogel composed of hyaluronic acid and alginate as a potential bioink for 3D bioprinting of articular cartilage engineering constructs. *Acta Biomaterialia*. 2020; 106:114–123. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.01.046.
2. Fatimi A., Okoro O.V., Shavandi A. Biopolymer-Based Hydrogels for 3D Bioprinting. *Mater. Proc.* 2021;7:19. DOI: 10.3390/IOCP2021-11284.
3. Kačarević Ž.P., Rider P.M., Alkildani S., Retnasingh S., Smeets R., Jung O., Ivanišević Z., Barbeck M. An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects. *Materials (Basel)*. 2018;11:2199. DOI: 10.3390/ma11112199.
4. Saini G., Segaran N., Mayer J.L., Saini A., Albadawi H., Oklu R. Applications of 3D Bioprinting in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *J. Clin. Med.* 2021;10(21):4966. DOI: 10.3390/jcm10214966.
5. Shiwarski D.J., Hudson A.R., Tashman J.W., Feinberg A.W. Emergence of FRESH 3D printing as a platform for advanced tissue biofabrication. *APL Bioeng.* 2021;5(1):010904. DOI: 10.1063/5.0032777.



## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Мачулин Семён Александрович\***, ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;  
**e-mail:** [machulin\\_s@rambler.ru](mailto:machulin_s@rambler.ru)

**Semen A. Machulin\***, State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [machulin\\_s@rambler.ru](mailto:machulin_s@rambler.ru)

**Астрелина Татьяна Алексеевна**, д.м.н., проф., ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;  
**e-mail:** [t\\_astrelina@mail.ru](mailto:t_astrelina@mail.ru)

**Tatiana A. Astrelina**, Dr. Sci. (Med.), Prof., State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [t\\_astrelina@mail.ru](mailto:t_astrelina@mail.ru)

**Усупжанова Дарья Юрьевна**, к.б.н., ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;  
**e-mail:** [usupzhanova94@mail.ru](mailto:usupzhanova94@mail.ru)

**Daria Yu. Usupzhanova**, Cand. Sci. (Biol.), State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [usupzhanova94@mail.ru](mailto:usupzhanova94@mail.ru)

**Завьялов Антон Олегович**, ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;  
**e-mail:** [antonzavval@yandex.ru](mailto:antonzavval@yandex.ru)

**Anton O. Zavialov**, State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [antonzavval@yandex.ru](mailto:antonzavval@yandex.ru)

**Маливанова Татьяна Фёдоровна**, к.м.н., ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;  
**e-mail:** [tmalivanova@yandex.ru](mailto:tmalivanova@yandex.ru)

**Tatiana F. Malivanova**, Cand. Sci. (Med.), State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [tmalivanova@yandex.ru](mailto:tmalivanova@yandex.ru)

**Головкова Анастасия Игоревна**, ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;  
**e-mail:** [nikidan88@mail.ru](mailto:nikidan88@mail.ru)

**Anastasia I. Golovkova**, State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [nikidan88@mail.ru](mailto:nikidan88@mail.ru)

**Кобзева Ирина Владимировна**, к.м.н., ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;

**e-mail:** [irina-kobzeva@yandex.ru](mailto:irina-kobzeva@yandex.ru)

**Сучкова Юлия Борисовна**, к.м.н., ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;

**e-mail:** [yuls11349@yandex.ru](mailto:yuls11349@yandex.ru)

**Брунчуков Виталий Андреевич**, ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;

**e-mail:** [brunya2008@yandex.ru](mailto:brunya2008@yandex.ru)

**Расторгуева Анна Андреевна**, ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;

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

**Никитина Виктория Андреевна**, ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;

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

**Ломоносова Елена Евгеньевна**, ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;

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

**Михадаркина Ольга Геннадьевна**, ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;

**e-mail:** [olya1019988@mail.ru](mailto:olya1019988@mail.ru)

**Irina V. Kobzeva**, Cand. Sci. (Med.), State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

**e-mail:** [irina-kobzeva@yandex.ru](mailto:irina-kobzeva@yandex.ru)

**Yulia B. Suchkova**, Cand. Sci. (Med.), State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

**e-mail:** [yuls11349@yandex.ru](mailto:yuls11349@yandex.ru)

**Vitaliy A. Brunchukov**, State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

**e-mail:** [brunya2008@yandex.ru](mailto:brunya2008@yandex.ru)

**Anna A. Rastorgueva**, State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

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

**Viktoria A. Nikitina**, State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

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

**Elena E. Lomonosova**, State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

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

**Olga G. Mihadarkina**, State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

**e-mail:** [olya1019988@mail.ru](mailto:olya1019988@mail.ru)

**Самойлов Александр Сергеевич**, д.м.н., чл.-корр. РАН, проф. РАН, ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России;  
**e-mail:** [fmba@fmba.gov.ru](mailto:fmba@fmba.gov.ru)

**Alexandr S. Samoilov**, Dr. Sci. (Med.), Corr. Member of the RAS, Prof. of the RAS, State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [fmba@fmba.gov.ru](mailto:fmba@fmba.gov.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИНФРАКРАСНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РЕГУЛЯЦИЮ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНЯХ ОРГАНИЗМА МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/KSJYLepr<sup>db/+</sup>

О.И. Степанова\*, Р.А. Клёсов, Х.Х. Семёнов, И.А. Помыткин, В.Н. Каркищенко

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

Изучали влияние курсового воздействия инфракрасного излучения (ИК) на патологические изменения в тканях организма у мутантных мышей C57BL/KsJYLepr<sup>db/+</sup> (db/db) с сахарным диабетом 2 типа с помощью аппарата «ЛАЗМА СТ». Аппарат позволяет осуществлять одновременный неинвазивный контроль состояния микроциркуляции крови и лимфы, а также определять уровень активности митохондриальных окислительных коферментов в тканях до и после терапии ИК.

ИК-волны (690 нм) оказывают положительное терапевтическое действие на функциональное состояние мышей линии db/db: наступает быстрое заживление ран кожного покрова, вызванного мацерацией, и пролонгированная нормализация показателей окислительного метаболизма (НАДН, ФАД, ПОМ) в тканях организма. ИК обладает накопительным эффектом и достоверно увеличивает как длительность жизни в 2,3–2,5 раза, так и её качество по сравнению с контрольной группой.

**Ключевые слова:** окислительный метаболизм, ИК-терапия, мыши db/db

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

**Для цитирования:** Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Помыткин И.А., Каркищенко В.Н. Изучение эффективности воздействия инфракрасного излучения на регуляцию окислительного метаболизма в тканях организма мышей линии C57BL/KsJYLepr<sup>db/+</sup>. *Биомедицина*. 2023;19(3E):59–65. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-59-65>

Поступила 14.04.2023

Принята после доработки 28.07.2023

Опубликована 06.11.2023

## EFFECT OF INFRARED RADIATION ON THE REGULATION OF OXIDATIVE METABOLISM IN C57BL/KSJYLepr<sup>db/+</sup> MICE

Olga I. Stepanova\*, Roman A. Klesov, Khyzyr Kh. Semenov, Igor A. Pomytkin,  
Vladislav N. Karkischenko

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

We studied the effect of infrared radiation (IR) course exposure on pathological changes in the tissues of C57BL/KsJYLepr<sup>db/+</sup> (db/db) mutant mice with type 2 diabetes mellitus using a LASMA ST device. This apparatus allows simultaneous non-invasive monitoring of blood and lymph microcirculation, as well as determining the activity of mitochondrial oxidative coenzymes in tissues before and after IR therapy. IR waves (690 nm) were found to have a positive therapeutic effect on the functional state of db/db mice. This included a rapid healing of skin wounds caused by maceration and prolonged normalization of oxidative metabolism parameters (NADH, FAD, POM) in body tissues. IR therapy has a cumulative effect, leading to a 2.3–2.5-fold increase in life expectancy and life quality, compared to the control group.

**Keywords:** oxidative metabolism, IR therapy, mice db/db

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

**For citation:** Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh., Pomytkin I.A., Karkischenko V.N. Effect of Infrared Radiation on the Regulation of Oxidative Metabolism in C57BL/KsJYLepr<sup>db/+</sup> Mice. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):59–65. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-59-65>

Submitted 14.04.2023

Revised 28.07.2023

Published 06.11.2023

## Введение

Инфракрасное излучение (ИК) — спектр электромагнитных колебаний с длиной волны от 400 мкм до 760 нм, эти лучи поглощаются тканями на глубину до 1 см. ИК-лучи с большей длиной волны проникают на 2–3 см глубже. Поскольку энергия ИК-лучей относительно мала, то при их поглощении наблюдается усиление колебательных и вращательных движений молекул, атомов: происходит ускорение броуновского движения молекул, электролитической диссоциации ионов в растворах, а также ускоренное движение электронов по орбитам. Все эти изменения приводят в первую очередь к образованию и выделению тепла, поэтому инфракрасные лучи еще называют калорическими или тепловыми. Тепло становится катализатором, ускоряющим биохимические процессы в тканях, а также повышающим обмен веществ и жизнедеятельность биологических структур, т.е. активатором окислительно-восстановительных реакций организма [1].

В результате воздействия ИК-облучения усиливается фагоцитарная активность лейкоцитов, активизируются иммунобиологические процессы, рассасываются и удаляются продукты метаболизма, что обуславливает развитие их противовоспалительного воздействия на организм. Активация пролиферации и усиление дифференцировки фибробластов приводят к ускорению грануляции ран и трофических язв, а также активируют синтез коллагеновых волокон. Усиление регенерационных процессов в тканях связывают с воздейст-

вием ИК на активацию синтеза АТФ в митохондриях клеток [6, 7]. По данным литературы, ИК в виде курсовой терапии широко применяется в клинике с лечебными целями. Между тем данных об эффективности коррекции с помощью ИК тканевых нарушений окислительного метаболизма путем неинвазивного контроля динамики изменения окислительно-восстановительных процессов на мелких лабораторных животных, в т.ч. с моделью сахарного диабета (СД), с использованием аппарата лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» мы не обнаружили, что позволило нам сформулировать цель настоящего исследования.

**Цель исследования** — изучить эффективность коррекции тканевых нарушений окислительного метаболизма и возможность восстановления качества жизни мышечной линии C57BL/KsJYLepr<sup>db/+</sup> с генетической моделью СД 2 типа при курсовом применении ИК.

## Материалы и методы

В работе использована генетическая биомодель СД 2 типа на мышах линии C57BL/KsJYLepr<sup>db/+</sup>, которые несут рецессивный ген leptin receptor — Lepr<sup>db</sup> — (db) (8-я группа сцепления, 4-я хромосома). В исследовании приняли участие мышингомозиготы db/db с инсулинонезависимым диабетом (n=30), а также фенотипически здоровые мышигетерозиготы db/m+, норма этой линии (n=6). При синдроме инсулинорезистентности развивается дисфункция эндотелия сосудов и, в частности, наруша-

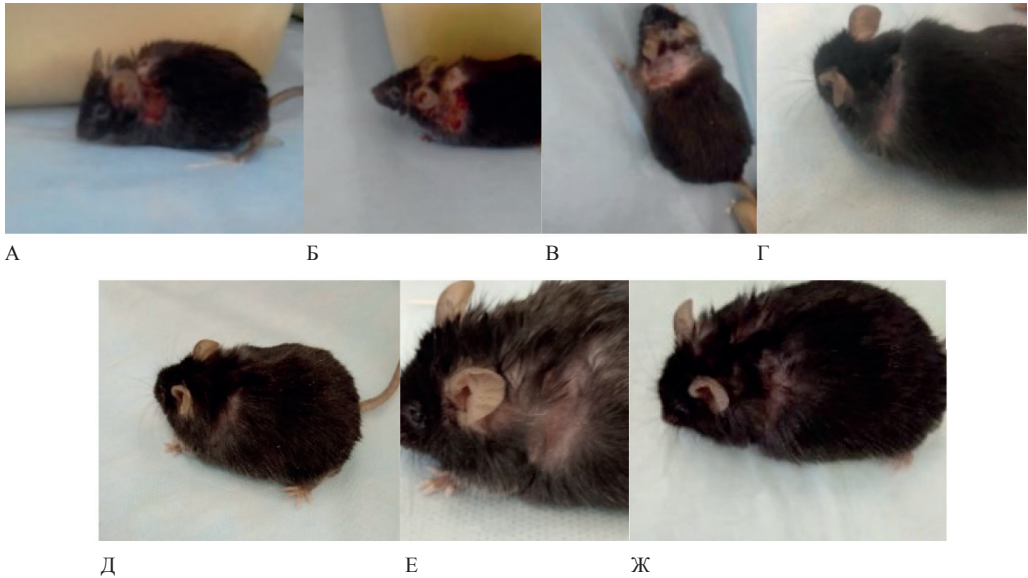
ется синтез оксида азота (NO) в сосудистой стенке (оксид азота является мощным вазодилататором). NO, как известно, оказывает сдерживающее влияние на пролиферацию гладкомышечных клеток в сосудах, тормозит адгезию моноцитов к эндотелию сосудистой стенки, снижает перекисное окисление липидов, т.е. предохраняет стенки сосудов от повреждения. Поэтому развивающаяся при СД 2 типа дисфункция эндотелия в результате дефицита NO способствует развитию нарушений микроциркуляции и формированию атеросклеротического повреждения сосудов. У мышей db/db с инсулинорезистентностью дисфункция сосудистого эндотелия проявляется возникновением мокнущих язвенных мацераций кожи в области холки [4]. Изучали динамику восстановления микроциркуляции в коже у мышей db/db с СД 2 типа с помощью аппарата лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» до и после терапии ИК. Аппарат «ЛАЗМА СТ» в реальном времени неинвазивно определяет состояние микроциркуляции (периферического кровотока, лимфотока) и уровень окислительных-восстановительных процессов по активности коферментов в ткани: восстановленного никотинамид-адениндинуклеотида (НАДН) и окисленного флавин-адениндинуклеотида (ФАД), которые являются биомаркерами состояния окислительного метаболизма в ткани, а также показателя окислительного метаболизма (ПОМ), рассчитываемого автоматически [2, 5]. Терапию ИК-облучения проводили с помощью экспериментального прибора с длиной волны 690 нм, размещенного на расстоянии 30 см от поверхности кожи животных. Проведены курсовые воздействия по 14 процедур с длительностью сеансов облучения по 30 мин.

### Результаты и их обсуждение

С помощью прибора «ЛАЗМА СТ» у мышей линии db/db установлены изменения по функциональному состоянию микроцир-

куляторно-тканевой системы: с декомпенсацией (n=7) и с повышенной активностью (n=14), из которых 8 — с субкомпенсацией и 6 — с компенсацией. В группе мышей db/db с выявленной декомпенсацией имелось животное с массой тела 40 г (рис. 1А) и с мокнущей язвенной мацерацией кожи в области холки и ушей. До возникновения мацерации масса животного составляла 54 г. Аппарат «ЛАЗМА СТ» позволил в реальном времени определить у этого животного состояние декомпенсированного окислительного метаболизма: высокие амплитуды — НАДН=2,283; ФАД=1,358 и низкий ПОМ=1,939 — достоверно отличались от значений нормы (здоровых животных db/m+) аналогичных показателей (НАДН=0,54±0,15; ФАД=0,77±0,13 и ПОМ=13,95±4,98). Во время курса ИК-терапии у мыши db/db с мокнущей язвенной мацерацией из группы декомпенсации выявлено, что после 7-го сеанса мокнущая мацерация подсохла и площадь язвы уменьшилась (рис. 1Б). К 10-му дню терапии мацерация значительно зажила, без рубцов (рис. 1В). После 14-го сеанса ИК-терапии мацерация кожного покрова полностью исчезла (рис. 1Г).

Через 24 ч после последнего сеанса терапии проведено исследование на аппарате «ЛАЗМА СТ» мыши db/db с ранее выявленной мацерацией. Выявлено полное заживление повреждений кожного покрова в области холки и ушей. Установлено положительное влияние ИК-терапии на окислительный метаболизм как по микроциркуляции (активность трофики повысилась), так и по флуоресценции коферментов — амплитуды снизились в 3,8 раза и ПОМ вырос в 5 раз с 1,98 до 9,8. Состояние тяжести патологии, обусловленной СД 2 типа, у мыши db/db после курса ИК-терапии с декомпенсацией улучшилось до выраженной компенсации. Также после ИК-терапии масса тела этой мыши db/db увеличилась на 35%, с 40 до 54 г на 50-й день



**Рис. 1.** Динамика заживления язв мацерации кожи у мыши линии *db/db* до, во время и после облучения ИК; длительность сеанса — 30 мин. А — мацерация до терапии ИК; Б — после 7-го сеанса ИК-терапии; В — после 10-го сеанса ИК-терапии; Г — после 14-го сеанса ИК-терапии; Д — через 24 ч после последнего сеанса ИК-терапии; Е — через 27 дней после ИК-терапии; Ж — через 60 дней после ИК-терапии.

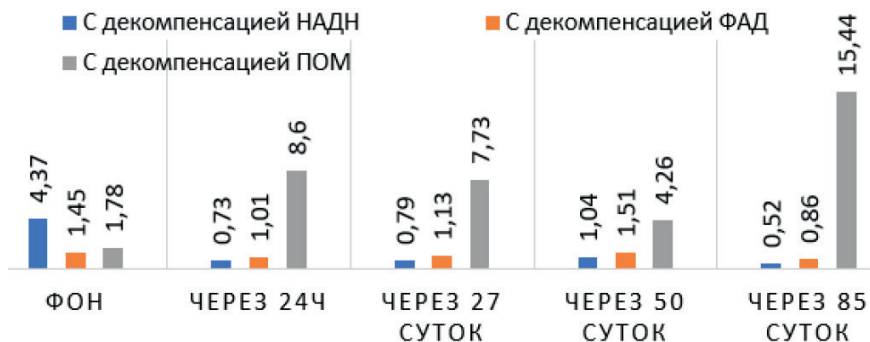
**Fig. 1.** Healing dynamics of skin maceration ulcers in a *db/db* mouse before, during and after IR irradiation; session duration — 30 min. А — maceration before IR therapy; Б — after 7 sessions of IR therapy; В — after 10 sessions of IR therapy; Г — after 14 sessions of therapy; Д — after 24 hours after the last session of IR therapy; Е — 27 days after IR therapy; Ж — 60 days after IR therapy.

исследования, а к 85-му дню наблюдений масса тела составляла 54 г. Не было выявлено повторной мацерации кожных покровов при дальнейшем наблюдении у мыши *db/db* до конца жизни животного (рис. 1Д, Е, Ж). В группе мышей с декомпенсацией СД 2 типа до ИК-терапии (данные аппарата «ЛАЗМА СТ») амплитуды коферментов были высокими (рис. 2): для кофермента НАДН амплитуда составляла  $4,37 \pm 1,85$ , для кофермента ФАД —  $1,45 \pm 0,36$ , а ПОМ был достоверно низким по сравнению другими группами и составлял  $1,78 \pm 0,52$  (в группах с субкомпенсацией  $7,29 \pm 1,45$  и компенсацией  $11,41 \pm 2,36$ ;  $p < 0,05$ ). После курса ИК-терапии продолжительностью 14 дней в группе с декомпенсацией улучшилась активность трофики, повысилась микроциркуляция крови и лимфы, а также по результатам исследования флуоресцен-

ции коферментов амплитуды их снизились с  $4,37 \pm 1,85$  до  $0,73 \pm 0,16$  НАДН (в 6 раз), а ПОМ увеличился в 5 раз, с  $1,78 \pm 0,52$  до  $8,60 \pm 1,91$  ( $p < 0,05$ ), по сравнению с данными до ИК-терапии. Позитивная динамика ИК-терапии в этой группе по окислительному метаболизму (НАДН= $0,52 \pm 0,18$ ; ФАД= $0,86 \pm 0,18$  и ПОМ= $15,44 \pm 6,15$ ) сохранялась и до 85-го дня наблюдений (рис. 2) по сравнению с другими группами ( $p < 0,05$ ), также получившими терапию ИК. У здоровых мышей *db/m+* (норма) эти показатели составляют НАДН= $0,54 \pm 0,15$ ; ФАД= $0,77 \pm 0,13$  и ПОМ= $13,95 \pm 4,98$ .

В группах с субкомпенсацией и компенсацией СД 2 типа после курса ИК-терапии не были получены выраженные изменения результатов по окислительному метаболизму в тканях на аппарате «ЛАЗМА СТ», однако к 85-му дню наблюдения отмечено,

## ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ КОФЕРМЕНТОВ НАДН, ФАД И ПОМ ПОСЛЕ ИФК ТЕРАПИИ У МЫШЕЙ ДВ/ДВ С ДЕКОМПЕНСАЦИЕЙ



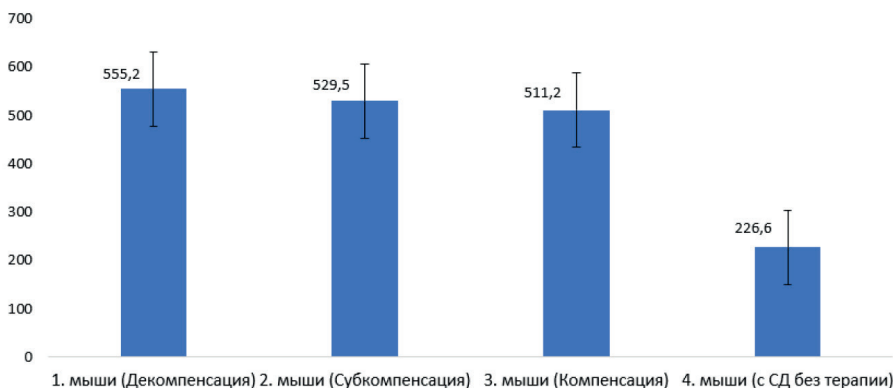
**Рис. 2.** Динамика изменения активности коферментов окислительного метаболизма в группе с декомпенсацией после курса терапии ИК (средние значения).

**Fig. 2.** Dynamics of activity changes in coenzymes of oxidative metabolism in the group with decompensation after a course of IR therapy (average values).

что мыши db/db с раннее зафиксированной субкомпенсацией перешли в состояние компенсации (амплитуды коферментов составили: НАДН=0,73±0,29; ФАД=1,38±0,51 и ПОМ=9,0±4,75). Животные из группы компенсации в конце исследования остались в том же состоянии (амплитуды коферментов: НАДН=0,72±0,21; ФАД=1,77±0,63 и ПОМ=7,54±2,47). Такое пролонгирован-

ное воздействие на стимулирующие восстановительные процессы в тканях у всех групп мышей происходит за счет мобилизации собственных резервов организма, после терапии ИК-волнами.

Известно, что развитие терапевтического эффекта на воздействие любого стресс-фактора реализуется за счет активизации механизмов неспецифического адаптаци-



**Рис. 3.** Длительность жизни мышей db/db в группах с разной степенью исходной тяжести функционального состояния организма после курса терапии ИК (средние значения).

**Fig. 3.** db/db mice lifespan in groups with varying levels of functional state organism severity after course of IR therapy (average values).



онного синдрома ключевых систем и механизмов их аутофагии, которые мобилизуют для перестройки патологического процесса в тканях на регенерацию и восстановление в них адекватного морфофункционального взаимодействия — усиление энергозатрат, это выражается возросшим расходом АТФ, проявляется усилением процессов гликолиза в тканях и структурными перестройками тканевых молекул [3], что повышает резервы устойчивости тканей и организмов к действию неблагоприятных факторов. Именно поэтому ИК-излучение, действуя на организм мышей db/db как адаптоген, достоверно повышает в 2,3–2,5 раза длительность жизни животных и улучшает ее качество по сравнению с контролем (мышы db/db без терапии, рис. 3).

## Выводы

1. ИК-облучение оказывает положительное терапевтическое действие

на тканевый метаболизм мышей линии C57BL/KsJYLepr<sup>db/+</sup> с СД 2 типа: наступает заживление ран кожного покрова, вызванных мацерацией, и пролонгированная нормализация показателей окислительного метаболизма (НАДН, ФАД, ПОМ) в организме.

2. К выраженному терапевтическому воздействию ИК более восприимчивы мыши db/db с более выраженной степенью нарушения функционального состояния организма.

3. ИК-терапия обладает накопительным терапевтическим эффектом, т.к. применение ИК достоверно увеличивает сроки жизни мышей в 2,3–2,5 раза и её качество, по сравнению с контрольной группой (без ИК-терапии).

4. ИК-излучение (с длиной волны 690 нм) при реализации терапевтического эффекта выступает в роли адаптогена, стимулирующего восстановительные процессы в тканях за счет мобилизации собственных резервов организма.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Башкатов А.Н. и др. Оптические свойства кожи человека, подкожных и слизистых тканей в диапазоне длин волн от 400 до 2000 нм. *Журнал физики D: Прикладная физика*. 2005;38(15):2543. [Bashkatov A.N., et al. Opticheskie svoystva kozhi cheloveka, podkozhnyh i slizistyh tkaney v diapazone dlin voln ot 400 do 2000 nm [Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm]. *Zhurnal fiziki D: Prikladnaya fizika [Journal of Physics D: Applied Physics]*. 2005;38(15):2543. (In Russian)].
2. *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови*. Под ред. А.И. Крупаткина, В.В. Сидорова: Рук-во для врачей. 2005:57. [*Lazernaya dopplerovskaya fluometriya mikrocirkulyacii krovi [Laser Doppler flowmetry of blood microcirculation]*. Ed. by. A.I. Krupatkin, V.V. Sidorov: Guide for doctors. 2005:57. (In Russian)].
3. Онищенко Н.А. Цитогенетическая рекапитуляция, индуцированная медикаментозными препаратами, универсальный этап формирования срочной защиты органов от повреждения при трансплантации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016;60(4):148–153. [Onishchenko N.A. Citogeneticheskaya rekapitulaciya, inducirovannaya medikamentoznymi preparatami, universal'nyj etap formirovaniya srochnoj zashchity organov ot povrezhdeniya pri transplantacii [Cytogenetic recapitulation, induced by medical preparations, as the universal stage of formation of urgent protection against damage at organ transplantation]. *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 2016;60(4):148–153. (In Russian)].
4. Степанова О.И., Каркищенко В.Н., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Галахова Т.В., Онищенко Н.А. Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышах линии C57BL/KsJYLepr<sup>db/+</sup>. *Биомедицина*. 2009;2:28–40. [Stepanova O.I., Karkischenko V.N., Baranova O.V., Semenov H.H., Beskova T.B., Galahova T.V., Onishchenko N.A. Geneticheskaya model' sahnogo diabeta 2 tipa na mutantnyh myshah linii C57BL/KsJYLeprdb/+ [The mutant mice C57BL/KsJYLeprdb/+ as the genetic model of diabetes 2 type]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2009;2:28–40. (In Russian)].
5. Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Помыткин И.А., Каркищенко В.Н. Новый диагностический подход для оценки тканевых изменений при сахарном диабете типа 2 у мышей с помощью прибора «ЛАЗМА СТ». *Биомедицина*. 2022;18(3):37–44. [Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh.,

- Pomytkin I.A., Karkischenko V.N. Novyj diagnosticheskiy podhod dlya ocenki tkanevyh izmenenij pri saharном diabete tipa 2 u myshej s pomoshch'yu pribora "LAZMA ST" [A New Diagnostic Approach to Assessing Tissue Changes in Type 2 Diabetes Mellitus in Mice Using "LASMA ST" Device]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(3):37–44. (In Russian).
6. Passarella S., Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2014;140:344–358.
7. Tsai S.R., et al. Low-level light therapy potentiates NPe6-mediated photodynamic therapy in a human osteosarcoma cell line via increased ATP. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;12(1):123–130. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.10.009.

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Степанова Ольга Ивановна\***, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;  
e-mail: [olgsima50@mail.ru](mailto:olgsima50@mail.ru)

**Olga I. Stepanova\***, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [olgsima50@mail.ru](mailto:olgsima50@mail.ru)

**Клёсов Роман Алексеевич**, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;  
e-mail: [klesrom@mail.ru](mailto:klesrom@mail.ru)

**Roman A. Klesov**, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [klesrom@mail.ru](mailto:klesrom@mail.ru)

**Семёнов Хызыр Хыйсаевич**, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

**Khyzyr Kh. Semenov**, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia

**Помыткин Игорь Анатольевич**, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;  
e-mail: [ipomytkin@mail.ru](mailto:ipomytkin@mail.ru)

**Igor A. Pomytkin**, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [ipomytkin@mail.ru](mailto:ipomytkin@mail.ru)

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

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

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



## ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЫСОКИХ ДОЗ ПРОТОНОВ НА ИНДУКЦИЮ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ У МЫШЕЙ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ АСЦИТНЫХ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА *EX VIVO*

Н.С. Стрельникова<sup>1,\*</sup>, О.М. Розанова<sup>2</sup>, Е.Н. Смирнова<sup>2</sup>,  
Т.А. Белякова<sup>1</sup>, А.В. Смирнов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Филиал «Физико-технический центр» ФГБУН «Физический институт им. П.Н. Лебедева»  
РАН142281, Российская Федерация, Московская обл., Протвино, Академический пр., 2

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН  
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пущино, ул. Институтская, 3

Изучены закономерности индукции солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей в короткие (1 мес.) и отдаленные (18 мес.) сроки после инокуляции асцитных клеток, облученных *ex vivo* пучком протонов дозами 30, 60, 90, 120 и 150 Гр. Скорость роста солидной опухоли после инокуляции облученных клеток *ex vivo* совпадала с ростом опухолей контрольной группы. Частота индукции опухолей у мышей с перевитыми клетками АКЭ была дозозависимой и уменьшалась с 80 до 0% с ростом дозы. Таким образом, использование модели облучения опухолевых клеток *ex vivo* с последующей перевивкой *in vivo* позволило нам определить параметры противоопухолевого действия новых схем протонной терапии.

**Ключевые слова:** асцитная карцинома Эрлиха, протоны, *ex vivo*, рост опухоли, мыши

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

**Источники финансирования:** работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-01027-22-00 при частичном финансировании из средств договора НИР № 28/22 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

**Для цитирования:** Стрельникова Н.С., Розанова О.М., Смирнова Е.Н., Белякова Т.А., Смирнов А.В. Изучение эффективности высоких доз протонов на индукцию солидных опухолей у мышей при облучении асцитных клеток карциномы Эрлиха *ex vivo*. *Биомедицина*. 2023;19(3E):66–70. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-66-70>

Поступила 10.04.2023

Принята после доработки 14.04.2023

Опубликована 06.11.2023

## EFFICACY OF HIGH DOSES OF PROTONS ON THE INDUCTION OF SOLID TUMORS IN MICE BY *EX VIVO* IRRADIATION OF EHRLICH ASCITIC CARCINOMA CELLS

Nataliia S. Strelnikova<sup>1,\*</sup>, Olga M. Rozanova<sup>2</sup>, Helena N. Smirnova<sup>2</sup>,  
Tatiana A. Belyakova<sup>1</sup>, Aleksandr V. Smirnov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Branch “Physical Technical Center”, P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences  
142281, Russian Federation, Moscow Region, Protvino, Akademicheskij Passage, 2

<sup>2</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences  
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya Str., 3

We study the induction patterns of the solid form of Ehrlich ascitic carcinoma (EAC) in mice in the short- (1 month) and long-term (18 months) periods after inoculation of ascitic cells irradiated *ex vivo* with a proton beam at doses of 30, 60, 90, 120, and 150 Gr. The growth rate of solid tumors after inoculation of irradiated cells *ex vivo* coincided with the growth of tumors in the control group. The frequency of tumor induction in mice transplanted with EAC cells was dose-dependent and decreased from 80% to 0% along with an increase in radiation dose. Thus, using the *ex vivo* model of tumor cell irradiation followed by *in vivo* grafting allowed us to determine the parameters of the antitumor effect of new proton therapy regimens.

**Keywords:** Ehrlich ascites carcinoma, protons, *ex vivo*, tumor growth, mice

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

**Funding:** the work was carried out within fundamental scientific research on the topic of GZ No. 075-013027-22-00 and at the expense of partial financial support from the funds of the agreement between the PTC LPI RAS and ITEB RAS No. 28/22.

**For citation:** Strelnikova N.S., Rozanova O.M., Smirnova H.N., Belyakova T.A., Smirnov A.V. Efficacy of High Doses of Protons on the Induction of Solid Tumors in Mice by *Ex vivo* Irradiation of Ehrlich Ascitic Carcinoma Cells. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):66–70. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-66-70>

Submitted 10.04.2023

Revised 14.04.2023

Published 06.11.2023

## Введение

Протонная терапия (ПТ) является современным, активно развивающимся методом лучевой терапии. Использование технологии тонкого сканирующего пучка обеспечивает точную выгрузку дозы в опухоли, максимально снижая повреждение окружающих тканей. Ранее нами на модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) у мышей была показана возможность однократного облучения протонами в высоких дозах 30–80 Гр, которые не только полностью подавляли рост первичной опухоли, но и снижали частоту ее рецидивирования [1]. В настоящее время критическим компонентом в возникновении, росте, метастазировании и рецидивировании опухолей считают небольшой пул (0,01–4%) опухолевых стволовых клеток (ОСК) [5]. Показано, что ОСК проявляют повышенную устойчивость к химиотерапии и радиотерапии. Из-за сложности идентификации и выделения ОСК существует необходимость разработки новых моделей и подходов с использованием, в частности,

высоких доз протонов, которые, в отличие от фотонных излучений, можно корректно доставлять в мишень, что позволяет исследовать влияние излучения и его модификаций на ОСК.

**Целью работы** являлось изучение скорости роста и частоты индукции солидной формы АКЭ у мышей в короткие и отдаленные сроки после инокуляции асцитных клеток, облученных *ex vivo* пучком протонов в диапазоне доз 30–150 Гр.

## Материалы и методы

Эксперименты проводили на двухмесячных самцах мышей колонии SHK (масса тела 30–34 г), которых содержали в стандартных условиях вивария [3]. Дизайн эксперимента был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике. В качестве модели опухоли была использована асцитная форма АКЭ. Клетки АКЭ поддерживали *in vivo* в форме асцита у мышей SHK путем серийной внутрибрюшинной перевивки. Выделенные опухоле-

вые клетки ресуспендировали в физ. р-ре до концентрации  $20 \times 10^6$  клеток/мл и помещали в эппендорфы объемом 1,5 мл.

Облучение клеток протонами (~100 МэВ) в модифицированном пике Брэгга проводили методом сканирования по заданному объему в дозах 30–150 Гр на синхротроне комплекса ПТ ФТЦ ФИАН (Протвино). После облучения экспериментальным и контрольным мышам внутримышечно вводили  $2 \times 10^6$  клеток АКЭ в бедро левой лапы. В каждой группе было 10 мышей. Далее наблюдали за частотой индукции солидных опухолей и скоростью их роста. Размеры опухолей измеряли еженедельно и вычисляли объёмы по стандартной методике [2]. Для статистической оценки значимости различий применяли *t*-критерий Стьюдента и непараметрический *U*-критерий Манна — Уитни. Различия считали статистически не значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

В контрольной группе у всех мышей, которым были введены необлученные клетки, индуцировалась солидная опухоль, пальпируемая на 5-е сут (~0,4 см<sup>3</sup>), через 35 сут она достигала стандартного для этой модели объема ~7,5 см<sup>3</sup>. В группах мышей, которым были инокулированы облученные клетки, наблюдали появление опухолей у отдельных животных с задержкой

ми начала роста АКЭ, скорость их роста не отличалась от скорости роста опухолей у мышей контрольной группы. Возможно, что к моменту начала роста опухоли выжившие ОСК, преодолев иммунный контроль организма, дифференцировались и пролиферировали до стартового количества опухолевых клеток, который необходим для индукции роста АКЭ с той же скоростью.

В таблице представлена частота индукции опухолей у мышей после инокуляции облученных клеток АКЭ за время наблюдения до 18 мес. Появление опухолей наблюдалось в первые два месяца, а далее количество опухолей не изменялось до конца жизни экспериментальных животных. Таким образом, мы выявили критический период времени после инокуляции облученных *ex vivo* опухолевых клеток, в течение которого возникают опухоли, причем длительность этого интервала не зависела от дозы, в отличие от частоты индукции. Ранее нами при облучении солидной АКЭ у мышей *in vivo* однократно в дозах 60 и 80 Гр после полного подавления первичного опухолевого узла возобновление роста опухолей той же локализации начинали фиксировать на 5-й неделе, а самые поздние рецидивы возникали даже через 8 мес. после облучения [1]. Мы предполагаем, что при использовании данной модели после облучения суспензии *ex vivo* в сублетальных и летальных дозах протонов с последующей

**Таблица.** Частота индукции опухолей у мышей после инокуляции клеток АКЭ, облучённых протонами в дозах 30–150 Гр, в течение всего периода наблюдения

**Table.** Frequency of tumor induction in mice after inoculation of EAC cells irradiated with protons at doses of 30–150 Gr throughout the observation period

Доза облучения	Количество мышей с опухолями, %									
	1 мес.	2 мес.	3 мес.	4 мес.	5 мес.	6 мес.	7 мес.	8 мес.	~	18 мес.
0 Гр	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-
30 Гр	65	80	80	80	80	80	80	80	~	80
60 Гр	55	60	60	60	60	60	60	60	~	60
90 Гр	25	25	25	25	25	25	25	25	~	25
120 Гр	5	10	10	10	10	10	10	10	~	10
150 Гр	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0

инкубацией в условиях функционирования нормального иммунитета организма происходит гибель дифференцированных опухолевых клеток, и появление опухолей можно рассматривать как индукцию рецидивов. Опухоли возникали в той же локализации, динамика их роста совпадала с таковой после инокуляции 2 млн необлученных клеток. Появление рецидивов после облучения клеток *ex vivo* в сверхвысоких дозах подтверждает предположение, высказанное в работах других авторов, о ключевой роли ОСК в рецидивировании после лучевой терапии и их радиорезистентности [4].

## Заключение

Используя в работе однократно экстремально высокие для выживаемости клеток дозы, равные величине суммарной дозы

при радиотерапии, мы попытались оценить на модели облучения клеток АКЭ *ex vivo* достаточную «лимитирующую» дозу, при которой происходит не только полная гибель клеток опухоли, но и ингибирование сигнальных факторов и процессов, которые инициируют дифференцировку ОСК в опухолевые или их репопуляцию, что приводит к индукции роста опухоли у мышей. Регистрируемые опухоли являются интегральным показателем клеточной гибели, задержки деления клеток, стимулирования дифференцировки и пролиферации ОСК в условиях влияния микроокружения опухоли и иммунитета организма. Полученные результаты представляют интерес для разработок доклинических моделей оценки эффективности противоопухолевых воздействий.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Балакин В.Е., Белякова Т.А., Розанова О.М. и др. Использование модели солидной формы асцитной карциномы Эрлиха у мышей для исследования ранних и отдаленных последствий гипофракционированного протонного облучения. *Биомедицина*. 2021;17(3E):127–132. [Balakin V.E., Belyakova T.A., Rozanova O.M., et al. Ispol'zovanie modeli solidnoj formy ascitnoj karcinomy Erliha u myshej dlya issledovaniya rannih i otdalennyh posledstvij gipofrakcionirovannogo protonnogo oblucheniya [Study of early and remote effects of hypofractionated proton irradiation in a model of solid Ehrlich ascites carcinoma in mice]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(3E):127–132. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-127-132.
2. Розанова О.М., Смирнова Е.Н., Белякова Т.А. и др. Влияние последовательности действия нейтронного и протонного излучений на опухолевый ответ солидной карциномы Эрлиха и реакции кожи у мышей в ранние и отдаленные сроки. *Биофизика*. 2022;67(5):991–1001. [Rozanova O.M., Smirnova E.N., Belyakova T.A., et al. Vliyaniye pos-
- ledovatel'nosti dejstviya nejtronnogo i protonnogo izlucheniya na opuholevyj otvet solidnoj karcinomy Erliha i reakcii kozhi u myshej v rannie i otdalennyye sroki [Early and remote sequence effect of neutron and proton irradiation on the tumor response of solid Ehrlich carcinoma and skin reactions in mice]. *Biophysics*. 2022;67(5):991–1001. (In Russian)]. DOI: 10.31857/S0006302922050180.
3. Smith J.A., van den Broek F.A.R., Martorell J.C., et al. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of the FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments. *Lab. Anim.* 2007;41(2):143–160. DOI: 10.1258/002367707780378212.
4. Yang L., Shi P., Zhao G., et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1):8. DOI: 10.1038/s41392-020-0110-5.
5. Yin W., Wang J., Jiang L., Kang J. Cancer and stem cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2021;246(16):1791–1801. DOI: 10.1177/15353702211005390.

**СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS**

---

**Стрельникова Наталия Сергеевна\***, Филиал  
«Физико-технический центр» ФГБУН «Физи-  
ческий институт им. П.Н. Лебедева» РАН;  
**e-mail: [strelnikova.ns@lebedev.ru](mailto:strelnikova.ns@lebedev.ru)**

**Nataliia S. Strelnikova\***, Branch “Physical  
Technical Center”, P.N. Lebedev Physical Institute  
of the Russian Academy of Sciences;  
**e-mail: [strelnikova.ns@lebedev.ru](mailto:strelnikova.ns@lebedev.ru)**

**Розанова Ольга Митрофановна**, ФГБУН  
«Институт теоретической и экспериментальной  
биофизики» РАН;  
**e-mail: [rozanova.iteb@gmail.com](mailto:rozanova.iteb@gmail.com)**

**Olga M. Rozanova**, Institute of Theoretical and  
Experimental Biophysics of the Russian Academy  
of Sciences;  
**e-mail: [rozanova.iteb@gmail.com](mailto:rozanova.iteb@gmail.com)**

**Смирнова Елена Николаевна**, ФГБУН «Инс-  
титут теоретической и экспериментальной био-  
физики» РАН;  
**e-mail: [smirnova.elena04@gmail.com](mailto:smirnova.elena04@gmail.com)**

**Helena N. Smirnova**, Institute of Theoretical and  
Experimental Biophysics of the Russian Academy  
of Sciences;  
**e-mail: [smirnova.elena04@gmail.com](mailto:smirnova.elena04@gmail.com)**

**Белякова Татьяна Анатольевна**, Филиал  
«Физико-технический центр» ФГБУН «Физичес-  
кий институт им. П.Н. Лебедева» РАН;  
**e-mail: [belyakovata@lebedev.ru](mailto:belyakovata@lebedev.ru)**

**Tatiana A. Belyakova**, Branch “Physical Technical  
Center”, P.N. Lebedev Physical Institute of the  
Russian Academy of Sciences;  
**e-mail: [belyakovata@lebedev.ru](mailto:belyakovata@lebedev.ru)**

**Смирнов Александр Валентинович**, Филиал  
«Физико-технический центр» ФГБУН «Физи-  
ческий институт им. П.Н. Лебедева» РАН;  
**e-mail: [smirnov\\_av@inbox.ru](mailto:smirnov_av@inbox.ru)**

**Aleksandr V. Smirnov**, Branch “Physical Technical  
Center”, P.N. Lebedev Physical Institute of the  
Russian Academy of Sciences;  
**e-mail: [smirnov\\_av@inbox.ru](mailto:smirnov_av@inbox.ru)**

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАРМАКОНУТРИЕНТНОГО ЭНТЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ И ИНУЛИНА В КОРРЕКЦИИ МОТОРНЫХ РАССТРОЙСТВ КИШЕЧНИКА И МИКРОБИОЦЕНОЗА В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ В УСЛОВИЯХ ЭНДОТОКСЕМИИ

Н.С. Тропская<sup>1,2,\*</sup>, Е.А. Кислякова<sup>1</sup>, И.Г. Вилкова<sup>1</sup>, Ю.В. Гурман<sup>1</sup>, О.С. Кислицына<sup>1</sup>,  
Е.Н. Бородина<sup>1</sup>, Т.В. Черненькая<sup>1</sup>, Т.С. Попова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи  
им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»

129090, Российская Федерация, Москва, Большая Сухаревская пл., 3

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»  
125993, Российская Федерация, Москва, Волоколамское ш., 4

В экспериментах на крысах предложена схема коррекции моторных расстройств кишечника и микробиоценоза, включающая последовательное введение в тощую кишку фармаконутриентного энтерального питания («Интестамин», содержащий глутамин и трибутирин) и пребиотика инулин. Показано, что применение схемы в послеоперационном периоде в условиях эндотоксемии предотвращает избыточный бактериальный рост в тощей кишке, стимулирует появление пропульсивной перистальтики, устраняет патологические паттерны моторики и способствует раннему восстановлению координированной перистальтики тонкой кишки.

**Ключевые слова:** бутират, электрическая активность тонкой кишки, избыточный бактериальный рост, эндотоксемия

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

**Для цитирования:** Тропская Н.С., Кислякова Е.А., Вилкова И.Г., Гурман Ю.В., Кислицына О.С., Бородина Е.Н., Черненькая Т.В., Попова Т.С. Экспериментальное исследование эффективности фармаконутриентного энтерального питания и инулина в коррекции моторных расстройств кишечника и микробиоценоза в послеоперационном периоде в условиях эндотоксемии. *Биомедицина*. 2023;19(3E):71–76. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-71-76>

Поступила 05.04.2023

Принята после доработки 19.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFICACY OF PHARMACONUTRIENT ENTERAL NUTRITION AND INULIN IN THE CORRECTION OF INTESTINAL MOTOR DISORDERS AND MICROBIOCENOSIS IN THE POSTOPERATIVE PERIOD UNDER ENDOTOXEMIA CONDITIONS

Nataliya S. Tropskaya<sup>1,2,\*</sup>, Ekaterina A. Kislyakova<sup>1</sup>, Irina G. Vilkova<sup>1</sup>, Yulia V. Gurman<sup>1</sup>,  
Oksana S. Kislitsyna<sup>1</sup>, Yevgeniya N. Borodina<sup>1</sup>, Tatyana V. Chernen'kaya<sup>1</sup>,  
Tamara S. Popova<sup>1</sup>



<sup>1</sup> N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Department  
129090, Russian Federation, Moscow, B. Sukharevskaya Sq., 3

<sup>2</sup> Moscow Aviation Institute (National Research University)  
125993, Russian Federation, Moscow, Volokolamskoe Highway, 4

A scheme for correcting intestinal motor disorders and microbiocenosis is proposed. Experiments on rats included a sequential jejunum administration of pharmaconutrient enteral nutrition (Intestamine, containing glutamine and tributyrin) and inulin, a prebiotic preparation. The application of this scheme in the postoperative period in the setting of endotoxemia prevents excessive bacterial growth in the jejunum, stimulates the appearance of propulsive peristalsis, eliminates pathological motility patterns and promotes early recovery of coordinated peristalsis of the small intestine.

**Keywords:** butyrate, electrical activity of the small intestine, bacterial overgrowth, endotoxemia

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

**For citation:** Trop'skaya N.S., Kislyakova E.A., Vilkova I.G., Gurman Yu.V., Kislytsyna O.S., Borodina Ye.N., Chernen'kaya T.V., Popova T.S. Experimental Study of the Efficacy of Pharmaconutrient Enteral Nutrition and Inulin in the Correction of Intestinal Motor Disorders and Microbiocenosis in the Postoperative Period Under Endotoxemia Conditions. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):71–76. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-71-76>

Submitted 05.04.2023

Revised 19.05.2023

Published 06.11.2023

## Введение

В настоящее время раннее фармаконутриентное энтеральное питание с использованием глутамина, аргинина, омега-3 жирных кислот, бутирата, а также введение смесей, их содержащих, рассматриваются как интенсивное метаболическое лечение кишечника [2]. Другим подходом к метаболическому лечению является использование пребиотиков, активно стимулирующих в кишечнике метаболические процессы. В состав фармаконутриентной смеси для энтерального питания «Интестамин» входят глутамин и трибутирин. Трибутирин является структурированным липидом, состоящим из трех молекул бутирата, эстерифицированных глицеролом. В желудке и тонком кишечнике трибутирин гидролизует липазой до бутирата и глицерола, быстро всасывается в тонкой кишке и поступает в печень через портальную вену [6]. Инулин — это фруктоолигосахарид, или растворимая пребиотическая клетчатка, которая устойчива к воздействию пищеварительных ферментов и достигает

толстой кишки без существенных изменений. При ферментации инулина бактериями образуется бутират. Результаты экспериментов показали, что при моделировании колита, вызванного введением уксусной кислоты, добавка 0,1% трибутирина уменьшает повреждение кишечника, возможно, путем ингибирования апоптоза, способствуя формированию плотных межклеточных контактов и активации м-РНК экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста в слизистой толстой кишки [5]. Введение трибутирина снижает вызванное антибиотиками повреждение слизистой оболочки кишечника [3], что может частично объясняться тем фактом, что бутираты поддерживают рост бифидо- и лактобактерий [4]. В наших ранних исследованиях показано, что использование трибутирина как компонента нутритивной поддержки при экспериментальной эндотоксемии может являться физиологичным способом стимуляции перистальтики, приводящим к восстановлению моторной функции тонкой кишки [1].

**Целью работы** явилось изучение сочетанного влияния бутират-содержащей смеси для энтерального питания («Интестамин») и бутират-образующего пребиотика (инулин) на функциональное состояние кишечника у животных в ранние сроки после лапаротомии в сочетании с введением эндотоксина.

## Материалы и методы

Исследования выполнены на 18 крысах-самцах Wistar массой тела 400–450 г в возрасте 12 мес. Протокол исследования был одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

Крысы адаптировались в течение 1 мес. в виварии. Все животные содержались в лаборатории в контролируемых условиях окружающей среды при температуре +20–24 °С и влажности 45–65%, с режимом освещенности 800–2000 — свет, 2000–800 — сумеречное освещение.

Всем животным под наркозом проводили срединную лапаротомию. Выполняли имплантацию электродов и зонда в тонкую кишку. Затем внутривенно вводили р-р липополисахарида *Escherichia coli* (ЛПС *E. coli*) serotype 055:B5 в дозе 200 мкг/кг. В послеоперационный период проводили электрофизиологические исследования.

Первой группе животных (контрольная, n=9) в течение первых трех суток после операции натошак сначала выполнялась фоновая запись электрической активности тонкой кишки в течение 1 ч, затем внутрикишечно через зонд вводили физ. р-р в объеме 0,2 мл, и электрическая активность регистрировалась еще 2 ч. Начиная с 4-х сут после операции ежедневно до восстановления проводилась запись электрической активности тонкой кишки в течение 1 ч.

Второй группе животных (опытная, n=9) в течение первых трех суток после операции натошак сначала выполнялась фоновая запись электрической активности тонкой

кишки в течение 1 ч, затем в первые сутки внутрикишечно через зонд в течение 8 ч вводили р-р «Интестамина» в дозе 7,14 мл/кг, а во вторые и третьи сутки — однократно р-р инулина в дозе 40 мг/кг в объеме 0,2 мл. После введения растворов электрическая активность регистрировалась еще 2 ч. Начиная с 4-х сут после операции ежедневно до восстановления проводилась запись электрической активности тонкой кишки в течение 1 ч.

Кроме того, в отдельных экспериментах у животных первой и второй групп были взяты образцы тощей и слепой кишок для бактериологического анализа на 4 сут после операции.

Для статистического анализа использовали непараметрические критерии. Статистически значимыми считались значения при  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

У животных контрольной группы в первые сутки после операции в фоновых записях всех исследуемых участков тонкой кишки отмечались единичные всплески пиковых потенциалов и отдельных пачек пиковых потенциалов слабой интенсивности, мигрирующий миоэлектрический комплекс (ММК) отсутствовал. Электрическая активность тощей кишки была представлена фазами покоя и нерегулярной активности. Продолжительность нерегулярной активности превышала норму. На вторые сутки после операции в тощей кишке преобладала нерегулярная активность. Фаза регулярной активности отсутствовала. Следует отметить, что основной характерной особенностью в эти сроки явилось появление пачек высокоамплитудных пиковых потенциалов, превышающих по амплитуде обычные пиковые потенциалы в 2–4 раза. Период длительности пачек пиковых потенциалов составлял 3,5–4 сек. В основном такие высокоамплитудные пачки пиковых потенциалов возникали одновременно

на соседних участках тощей кишки. Однако наблюдались и распространяющиеся высокоамплитудные пачки пиковых потенциалов — гигантские мигрирующие спайки, количество которых в течение часа составляло от 2 до 4. Следует отметить появление в эти сроки длительных разрядов пиковых потенциалов, превышающих в 1,5–2 раза период медленных волн, соответствующих спастическим сокращениям кишки. На третьи сутки по-прежнему преобладала нерегулярная активность. Однако отмечалось появление регулярной активности, но ее продолжительность была ниже нормы. Так же как и в предыдущие сутки, в тощей кишке наблюдалось значительное количество эпизодов спастической активности и распространяющихся высокоамплитудных пачек пиковых потенциалов. На четвертые сутки в тощей кишке высокоамплитудные распространяющиеся пачки пиковых потенциалов исчезали. Наблюдалось формирование ММК. В тощей кишке присутствовали все фазы комплекса, однако их продолжительность и очередность была нарушена. На шестые сутки электрическая активность восстанавливалась — в тощей кишке наблюдались все фазы ММК, параметры фаз комплекса не отличались от нормальных значений.

Таким образом, нарушения электрической активности тонкой кишки у животных в послеоперационном периоде в условиях эндотоксемии имеют свои особенности, связанные с наличием эндотоксина в крови. Эти нарушения сводятся к появлению патологических паттернов и угнетению нормальной координированной перистальтики за счет исчезновения ММК (вплоть до 6 сут после операции).

У животных опытной группы в первые сутки после операции в фоновых записях электрическая активность тощей кишки была представлена фазами покоя и нерегулярной активности. ММК отсутствовал. Через 8 ч после введения в тощую кишку

«Интестамина» существенно уменьшались периоды покоя и увеличивалась нерегулярная активность. У некоторых животных появлялась регулярная активность (пропульсивная перистальтика). После введения «Интестамина» эпизодов спастической активности не было отмечено. На вторые сутки после операции электрическая активность фоновых записей была представлена всеми фазами комплекса, однако их процентное соотношение отличалось от нормы с существенным преобладанием нерегулярной активности. У всех животных регистрировалась регулярная активность нормальной продолжительности — 140 (115; 185) сек. ( $p > 0,05$ ). У некоторых крыс начинали формироваться единичные ММК. Также следует отметить отсутствие гигантских сокращений и эпизодов спастической активности. В эти сроки после введения инулина наблюдалось увеличение нерегулярной активности и уменьшение времени покоя. На третьи сутки после операции электрическая активность фоновых записей была представлена всеми фазами комплекса, однако за 1 ч регистрировалось только два комплекса с увеличенным периодом. После введения инулина исчезали периоды покоя, снижалась регулярная и увеличивалась нерегулярная активность. На четвертые сутки регистрировалось 3–4 ММК в час с нормальным периодом 760 (630; 890) сек ( $p > 0,05$ ), и скоростью распространения 2,2 (1,7; 2,5) см/мин ( $p > 0,05$ ).

Сочетанное применение смеси «Интестамин» и бутират-образующего пребиотика (инулин) приводит к нормализации пропульсивной перистальтики, устраняет патологические паттерны моторики и способствует восстановлению координированной перистальтики тонкой кишки на двое суток быстрее, чем в контрольной группе.

Восстановление координированной пропульсивной перистальтики у животных контрольной группы наблюдалось на 6 сут, в то время как применение сочетанного вве-

дения смеси «Интестамин» и инулина приводило к нормализации координированной пропульсивной перистальтики уже на 4 сут. Возможно, более раннее восстановление перистальтики было связано с нормализацией микробиоты кишечника.

В результате проведения бактериологических исследований на 4 сут после операции в обеих группах было установлено, что в группе животных без применения корректирующей терапии наблюдалось статистически значимое снижение титра *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. в слепой кишке по сравнению со здоровыми животными. Кроме того, наиболее важным фактом является то, что в полости тонкой кишки наблюдался рост *E. coli* — до  $10^5$  ( $10^4$ ;  $10^6$ ) КОЕ/мл, а также появление патогенной гемолитической *E. coli* в титрах  $10^2$  ( $0$ ;  $10^4$ ) КОЕ/мл. Такие данные свидетельствуют о том, что в тонкой кишке происходит развитие синдрома избыточного бактериаль-

ного роста. В группе животных с введением «Интестамина» и инулина наблюдалось статистически значимое снижение титра *Lactobacillus* spp. в слепой кишке по сравнению со здоровыми животными. При этом титры *Bifidobacterium* spp. не отличались от здоровых животных. В полости тонкой кишки титр *E. coli* соответствовал норме, а роста патогенных бактерий не выявлялось.

## Выводы

Сочетанное применение бутират-содержащей смеси для энтерального питания и бутират-образующего пребиотика в ранние сроки после лапаротомии в сочетании с введением эндотоксина предотвращает избыточный бактериальный рост в тощей кишке, стимулирует появление пропульсивной перистальтики, устраняет патологические паттерны моторики и способствует раннему восстановлению координированной перистальтики тонкой кишки.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Кислякова Е.А., Тропская Н.С., Попова Т.С. Энтеральное введение трибутирина как компонента нутритивной поддержки в коррекции нарушений электрической активности тонкой кишки при экспериментальной эндотоксемии. *Биомедицина*. 2015;4:77–83. [Kislyakova E.A., Tropskaya N.S., Popova T.S. Enteral'noe vvedenie tributirina kak komponenta nutritivnoj podderzhki v korrekcii narushenij elektricheskoy aktivnosti tonkoj kishki pri eksperimental'noj endotoksemii [Enteral administration of tributyrin as an element of nutritional support in the treatment of disruption of the intestinal electrical activity during experimental endotoxemia]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2015;4:77–83. (In Russian).]
2. Попова Т.С., Тропская Н.С. *Фармаконутриенты. Парентеральное и энтеральное питание: нац. рук-во* / Под ред. Петрикова С.С., Хубутия М.Ш., Поповой Т.С., 2023, 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2023:259–296. [Popova T.S., Tropskaya N.S. *Farmakonutrienty. Parenteral'noe i enteral'noe pitanie: nats. ruk-vo*. [Pharmacnutrients. Parenteral and enteral nutrition: Nat. Guideline] / Ed. by Petrikov S.S., Hubutiya M.Sh., Popova T.S., 2023, 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media Publ., 2023:259–296. (In Russian)].
3. Cresci G., Nagy L.E., Ganapathy V. Lactobacillus GG and tributyrin supplementation reduce antibiotic-induced intestinal injury. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 2013;37(6):763–774. DOI: 10.1177/0148607113486809.
4. Delcenserie V., Martel D., Lamoureux M., Amiot J., Boutin Y., Roy D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2008;10(1–2):37–54.
5. Hou Y., Wang L., Yi D., Ding B., Chen X., Wang Q., Zhu H., Liu Y., Yin Y., Gong J., Wu G. Dietary supplementation with tributyrin alleviates intestinal injury in piglets challenged with intrarectal administration of acetic acid. *Br. J. Nutr.* 2014;111(10):1748–1758. DOI: 10.1017/S0007114514000038.
6. Wachtershauser A., Stein J. Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur. J. Nutr.* 2000;39(4):164–171. DOI: 10.1007/s003940070020.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Тропская Наталия Сергеевна\***, д.б.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», ФГБОУ ВО «Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)»;

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

**Nataliya S. Tropuskaya\***, Dr. Sci. (Biol.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department, Moscow Aviation Institute (National Research University);

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

**Кислякова Екатерина Александровна**, к.б.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

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

**Ekaterina A. Kislyakova**, Cand. Sci. (Biol.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;

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

**Вилкова Ирина Геннадьевна**, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

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

**Irina G. Vilkova**, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;

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

**Гурман Юлия Валерьевна**, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

**e-mail:** [julka\\_gurman95@mail.ru](mailto:julka_gurman95@mail.ru)

**Yulia V. Gurman**, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;

**e-mail:** [julka\\_gurman95@mail.ru](mailto:julka_gurman95@mail.ru)

**Кислицына Оксана Сергеевна**, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

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

**Oksana S. Kislitsyna**, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;

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

**Бородина Евгения Никитична**, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

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

**Yevgeniya N. Borodina**, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;

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

**Черненко Татьяна Витальевна**, к.м.н., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

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

**Tatyana V. Chernen'kaya**, Cand. Sci. (Med.), N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;

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

**Попова Тамара Сергеевна**, д.б.н., проф., ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

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

**Tamara S. Popova**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Care Department;

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

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕПАРИНА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИГЕН-АНТИТЕЛО В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА БЕВАЦИЗУМАБ И ЕГО МИШЕНИ VEGF-A165

М.П. Шевелёва\*, Е.Л. Немашкалова, Е.И. Дерюшева

*Институт биологического приборостроения  
ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН  
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3*

В данной работе проведено исследование влияния гепарина на процесс связывания VEGF-A165 — наиболее распространенного и важного из факторов роста — и моноклонального антитела бевацизумаб методом биослойной интерферометрии. Смоделирован комплекс полноразмерного антитела бевацизумаб с VEGF-A165. Полученные данные можно использовать при терапии с использованием данного антитела, а также в разработке других терапевтических антител с максимальной специфичностью к мишеням в различных условиях.

**Ключевые слова:** фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), бевацизумаб, гепарин

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

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-24-00083.

**Для цитирования:** Шевелёва М.П., Немашкалова Е.Л., Дерюшева Е.И. Изучение влияния гепарина на взаимодействие антиген-антитело в модельной системе терапевтического антитела бевацизумаб и его мишени VEGF-A165. *Биомедицина*. 2023;19(3E):77–80. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-77-80>

Поступила 20.04.2023

Принята после доработки 15.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## EFFECT OF HEPARIN ON ANTIGEN – ANTIBODY INTERACTION IN A MODEL SYSTEM OF THE BEVACIZUMAB THERAPEUTIC ANTIBODY AND ITS TARGET VEGF-A165

Marina P. Shevel'yova\*, Ekaterina L. Nemashkalova, Evgeniya I. Deryusheva

*Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research  
of the Russian Academy of Sciences  
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3*

In this work, we studied the effect of heparin on the binding process of VEGF-A165, the most common and important growth factor, and the monoclonal antibody bevacizumab by bio-layer interferometry. A complex of the full-length bevacizumab antibody with VEGF-A165 was modeled. The data obtained can be used in therapy with this antibody, as well as in the development of other therapeutic antibodies with maximum target specificity under various conditions.

**Keywords:** vascular endothelial growth factor (VEGF), bevacizumab, heparin

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

**Funding:** research was funded by a grant from the Russian Science Foundation No. 22-24-00083.

**For citation:** Shevelyova M.P., Nemashkalova E.L., Deryusheva E.I. Effect of Heparin on Antigen-Antibody Interaction in a Model System of the Bevacizumab Therapeutic Antibody And its Target VEGF-A165. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):77–80. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-77-80>

*Submitted 20.04.2023*

*Revised 15.05.2023*

*Published 06.11.2023*

Наиболее эффективные таргетные препараты, занимающие основной финансовый объем фармацевтического рынка, представляют собой моноклональные антитела, отобранные из комбинаторных библиотек по принципу их наивысшего сродства к мишени. Исследование взаимодействия антитела и антигена проводится в условиях раствора, далёких от условий кровотока: в стандартных буферах отсутствуют сывороточный альбумин, иммуноглобулины, липопротеины, а также различные низкомолекулярные соединения и ионы, концентрация которых может варьировать в физиологических пределах или существенно изменяться при некоторых патологиях. Мажорные компоненты крови, а также низкомолекулярные агенты способны влиять на взаимодействие антиген-антитело за счет эффекта молекулярного краудинга или низкоспецифических взаимодействий с антигеном и антителом. Поиск способов сохранения функциональных свойств этих препаратов, которые при сохранении аффинности позволили бы снизить побочные эффекты и вводимую дозу при увеличении сроков хранения, является актуальной задачей медицинской биотехнологии, которая, в свою очередь, тесно связана с задачей изучения влияния различных добавок на взаимодействие антиген-антитело.

В данной работе было проведено изучение влияния гепарина на взаимодействие антиген-антитело в модельной системе терапевтического антитела бевацизумаб и его мишени VEGF-A165.

VEGF — это сигнальный белок, играющий наиболее важную роль в организме человека среди других факторов

роста [2]. Он вырабатывается клетками для стимулирования роста новых сосудов [4]. Актуальность исследования свойств VEGF обусловлена также его прогностической важностью при развитии различных заболеваний, а также эффективностью антиангиогенной терапии при лечении некоторых видов рака, тромбоза, ретинопатии и макулодистрофии и перспективностью применения терапевтических индукторов ангиогенеза [1]. Рецепторы к данному фактору присутствуют как на эндотелиальных, так и на других типах клеток, чем обусловлены множественные эффекты VEGF. VEGF-A относится к белкам с большой долей внутренней неупорядоченности, и на сегодня отсутствует кристаллическая структура полноразмерного белка, а существующие работы посвящены исследованию его отдельных частей. Недавно нами была предложена модель полноразмерного VEGF-A165, при этом линейные размеры модели и содержание элементов вторичной структуры соответствовали экспериментальным данным, полученным методами кругового дихроизма и динамического рассеяния света [8].

Бевацизумаб (DrugBank Accession Number, DB00112) представляет собой рекомбинантное гуманизованное моноклональное антитело, которое избирательно связывается и нейтрализует биологическую активность человеческого VEGF-A165 [5]. Для эффективной передачи сигнала VEGF требуется связывание с корцепторами, нейропилином и гепарином (HE). HE представляет собой кислый серосодержащий гликозаминогликан. В клинической практике он применяется как антикоагулянт

прямого действия [9]. Концентрация HE в плазме у клинически здоровых лиц составляет 1–2,4 мг×л-1 [3]. Связывание HE с VEGF-A165 модулирует связанный с ангиогенезом каскад [6, 7]. Ранее нами было показано, что HE не влияет на вторичную структуру VEGF-A165, но увеличивает площадь его гидрофобной поверхности и способствует его агрегации [8].

Полноразмерная разрешенная структура бевацизумаба и его комплекса с VEGF на сегодня отсутствует. Это делает практически невозможным прогнозирование необходимых изменений, ведущих к увеличению сродства антител к антигену, исходя из вклада отдельных аминокислот в поддержание стабильности структуры антитела. Также трудно оценить влияние лигандов различной природы, являющихся неотъемлемой частью реальных систем.

Кинетические и равновесную константы взаимодействия VEGF-A165 и бевацизумаба в присутствии HE определяли методом биослойной интерферометрии с использованием OCTET QKE System. В данной работе VEGF-A165 (0,5 мкМ) иммобилизовали химически через аминокислоты на поверхности биосенсора. Концентрация бевацизумаба в экспериментах составила 15 и 20 нМ. В качестве целевой добавки использовался гепарин в концентрациях 32–224 нМ. Расчет констант взаимодействия лиганда (VEGF-A165) с аналитом (бевацизумаб) проводили с использованием схемы бивалентного аналита и стандартной программы Octet Data Analysis. Равновесная константа диссоциации комплекса бевацизумаб–VEGF-A165  $0,15 \pm 0,43$  нМ совпадает с литературными данными [10], при этом добавление гепарина в концентрации 32 нМ не влияло на равновесную константу диссоциации комплекса. Добавление 224 нМ гепарина увеличило её в 38 раз:  $5,7 \pm 1,1$  нМ. В присутствии такой концентрации гепарина константа скорости ассоциации умень-

шилась в 15,8 раза, а константа скорости диссоциации увеличилась в 2,4 раза.

Для проведения *in silico* анализа взаимодействий антиген-бевацизумаб, а также установления возможного механизма влияния гепарина на комплекс антиген-антитело были смоделированы модели полноразмерного антитела и его комплекса с VEGF-A165. Моделирование проводилось на основе доступной кристаллической структуры фрагмента бевацизумаба (мутантная форма), представленной в PDB банке (PDB код 6BFT) и предсказанными серверами AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) и I-Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) тяжелой и легкой цепей бевацизумаба. Линейные размеры модели соответствовали экспериментальным данным, полученным методом динамического рассеяния света (гидродинамический радиус  $RH=6,4$  нм). Для моделирования комплекса VEGF-A165–бевацизумаб использовался сервер ClusPro (<https://cluspro.bu.edu/login.php>). С помощью специализированного скрипта для PyMol для полученного комплекса были найдены остатки, входящие в сайт взаимодействия, которые относятся как к рецептор-связывающему, так и гепарин-связывающему домену VEGF. Более того, предполагаемый сайт связывания HE-VEGF-A165 [8] имеет общие аминокислоты с сайтами связывания бевацизумаба и рецепторов, что может объяснить влияние HE на взаимодействие VEGF-A165 с антителом.

Таким образом, были получены данные о степени влияния гепарина на взаимодействие бевацизумаба с VEGF-A165, а также смоделирован комплекс полноразмерного антитела с VEGF-A165. Полученные результаты могут учитываться при терапии с использованием данного антитела, а также при разработке других терапевтических антител с максимальной специфичностью к мишеням в различных условиях и функциональной стабильностью.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Adamis A.P., Shima D.T. The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. *Retina*. 2005;25:111–118. DOI: 10.1097/00006982-200502000-00001.
2. Apte R.S., Chen D.S., Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176:1248–1264. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.021.
3. Engelberg H. Plasma heparin levels in normal man. *Circulation*. 1961;23:578–581. DOI: 10.1161/01.cir.23.4.578.
4. Ferrara N. VEGF-A: A critical regulator of blood vessel growth. *Eur. Cytokine Netw*. 2009;20:158–163. DOI: 10.1684/ecn.2009.0170.
5. Garcia J., Hurwitz H.I., Sandler A.B., Miles D., Coleman R.L., Deurloo R., Chinot O.L. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat. Rev*. 2020;86:102017. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102017.
6. Gitay-Goren H., Soker S., Vlodaysky I., Neufeld G. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J. Biol. Chem*. 1992;267:6093–6098. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)42666-X.
7. Keyt B.A., Berleau L.T., Nguyen H.V., Chen H., Heinsohn H., Vandlen R., Ferrara N. The carboxyl-terminal domain (111–165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem*. 1996;271:7788–7795. DOI: 10.1074/jbc.271.13.7788.
8. Nemashkalova E.L., Shevelyova M.P., Machulin A.V., Lykoshin D.D., Esipov R.S., Deryusheva E.I. Heparin-Induced Changes of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165) Structure. *Biomolecules*. 2023;13(1):98. DOI: 10.3390/biom13010098.
9. Onishi A., Ange K.St., Dordick J.S., Linhardt R.J. Heparin and anticoagulation. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 2016;21(7):1372–1392. DOI: 10.2741/4462.
10. Papadopoulos N., Martin J., Ruan Q., et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012;15:171–185. DOI: 10.1007/s10456-011-9249-6.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Шевелёва Марина Петровна\***, к.х.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

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

**Немашкалова Екатерина Леонидовна**, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

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

**Дерюшева Евгения Игоревна**, к.ф.-м.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

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

**Marina P. Shevelyova\***, Cand. Sci. (Chem.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

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

**Ekaterina L. Nemashkalova**, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

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

**Evgeniya I. Deryusheva**, Cand. Sci. (Phis.-Math.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

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

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-81-84>



## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ *DAPHNIA MAGNA STRAUS* В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТА ДЛЯ СКРИНИНГА ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

А.А. Бондаренко\*, А.С. Мелехова, А.Я. Беспалов, Т.Л. Горчакова, Л.И. Прокопенко

ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»  
192019, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

С использованием в качестве экспериментальной модели зоогидробионтов *Daphnia magna* Straus проведен первичный скрининг соединений группы аминоэфиров вальпроевой кислоты, обладающих противосудорожной и холиноблокирующей активностью, который позволил отобрать наиболее эффективные соединения для дальнейшего тестирования их на теплокровных животных. Отбор проводили по результатам определения минимальной эффективной концентрации по предотвращению атипичной двигательной гиперактивности, вызванной фенокарбаматом.

**Ключевые слова:** холинергические вещества, холиноблокаторы, первичный скрининг, *Daphnia magna* Straus

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

**Для цитирования:** Бондаренко А.А., Мелехова А.С., Беспалов А.Я., Горчакова Т.Л., Прокопенко Л.И. Использование *Daphnia magna* Straus в качестве тест-объекта для скрининга холинергических фармакологических веществ. *Биомедицина*. 2023;19(3E):81–84. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-81-84>

Поступила 20.04.2023

Принята после доработки 24.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## *DAPHNIA MAGNA STRAUS* AS A TEST OBJECT FOR SCREENING CHOLINERGIC PHARMACOLOGICAL SUBSTANCES

Anastasiya A. Bondarenko\*, Aleksandra S. Melekhova, Aleksandr Ya. Bepalov,  
Tat'jana L. Gorchakova, Ljubov' I. Prokopenko

Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia  
192019, Russian Federation, Saint Petersburg, Behtereva Str., 1

*Daphnia magna* Straus was used as an experimental zoohydrobiont model for primary screening of compounds of the valproic acid aminoether group with anticonvulsant and cholinoblocking activity. On this basis, the most effective compounds for further trials in warm-blooded animals were selected. The selection criterion included their minimum effective concentration for the prevention of atypical motor hyperactivity induced by phenylcarbamate.

**Keywords:** cholinergic substances, anticholinergic drugs, primary screening, *Daphnia magna* Straus

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

**For citation:** Bondarenko A.A., Melekhova A.S., Bepalov A.Ya., Gorchakova T.L., Prokopenko L.I. *Daphnia magna* Straus as a Test Object for Screening Cholinergic Pharmacological Substances. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):81–84. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-81-84>

Submitted 20.04.2023

Revised 24.04.2023

Published 06.11.2023

## Введение

Дафнии широко используются в экотоксикологических исследованиях по определению токсичности химических веществ. Вследствие того, что у дафний поведенческие реакции контролируются нервной системой, воздействие на них нейротропными веществами приводит к изменению их плавательной активности; таким образом, они могут быть использованы для проверки эффективности данной группы веществ [8]. Холинергическая медиаторная система дафний в настоящее время хорошо изучена, поэтому с их помощью возможно проведение первичного отбора препаратов холинергического типа действия [5].

Добавление в водную среду ингибиторов ацетилхолинэстеразы вызывает атипичную двигательную гиперактивность (АДГА) у дафний, что эквивалентно выраженному судорожному состоянию у теплокровных животных. Таким образом, по критерию предотвращения наступления АДГА можно проводить первичный отбор потенциальных противосудорожных препаратов, что позволит сократить количество используемых млекопитающих в экспериментальных исследованиях [7].

## Материалы и методы

Эксперименты проводили на зооидриобионтах *Daphnia magna* Straus, выращенных в лабораторных условиях в соответствии с требованиями международного стандарта по биотестированию воды [6]. Использовали в опытах синхронизированную культуру возрастом 7 сут. Биотестирование проводили в климатостате Р-2 (ООО «СФУ-Система», Россия), который поддерживает температуру  $20 \pm 1,0^\circ\text{C}$ .

В качестве объектов исследования была выбрана группа соединений ряда аминокислот вальпроевой кислоты (АВК), обладающих противосудорожной и холиноблокирующей активностью, синтезированных в ФГБУ «НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России» [3].

Среднелетальную концентрацию ( $ЛК_{50}$ ) определяли в соответствии с работой [4].

Для определения эффективной концентрации по предотвращению АДГА ( $ЭК_{99}$ ) pripravивали 4–6 разбавлений исследуемых веществ (по 3 пробы на каждую концентрацию), затем помещали в каждое разбавление по 4 дафнии. Через 1 ч добавляли в каждую емкость р-р фенилкарбамата (ФК) в концентрации, вызывающей АДГА

**Таблица.** Результаты определения  $ЭК_{99}$  при отравлении ФК, экспозиция 24 ч

**Table.** The results of the determination of  $EC_{99}$  with PC poisoning, exposure 24 hours

Препарат	$ЛК_{50}$ , мг/л ( $M \pm m$ )	$ЭК_{99}$ , мг/л ( $M \pm m$ )	$ЛК_{50}/ЭК_{99}$
Образец № 3 (Гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2пропилентаноата)	1240±430	26,50±5,89	46,8
Атропин	144±51,0	3,33±0,74	43,2
Образец № 12	181,3±47,3	4,20±0,93	43,2
Образец № 14	362,0±94,0	16,70±3,70	21,7
Образец № 4	13,3±3,0	0,84±0,19	15,8
Образец № 5	105,5±23,4	21,10±4,70	5,0
Образец № 15	39,2±13,6	16,70±3,70	2,3

**Примечание:**  $ЛК_{50}$  — среднелетальная концентрация;  $ЭК_{99}$  — минимальная эффективная концентрация по предотвращению АДГА;  $ЛК_{50}/ЭК_{99}$  — «терапевтический» интервал действия препаратов. Концентрации определяли методом пробит-анализа.

**Note:**  $ЛК_{50}$  — median lethal concentration;  $ЭК_{99}$  — minimum effective concentration by AMHA prevention;  $ЛК_{50}/ЭК_{99}$  — “therapeutic” drug action interval. Concentrations were determined by the probit analysis method.

у всех дафний с минимальным процентом летальности (0,06 мг/л) [4]. Три пробы с р-ром ФК без добавления исследуемых АВК использовали в качестве контроля. Через 24 ч визуально фиксировали наличие АДГА у дафний в каждой пробе. ЭК<sub>99</sub> рассчитывали методом пробит-анализа. Каждый эксперимент повторяли трижды.

### Результаты исследований

В таблице представлены результаты эксперимента. ФК был выбран в качестве отравляющего агента, т.к. именно он применяется при моделировании тяжелого отравления теплокровных животных обратимыми ингибиторами ацетилхолинэстеразы для поиска эффективных противосудорожных препаратов [2].

Активность тестируемых препаратов сравнивали с атропином (неселективным М-холиноблокатором), являющимся обще-

принятым антидотом при отравлении карбаматами [1].

По результатам эксперимента было показано, что наиболее высокую активность среди обследованных препаратов по предотвращению наступления АДГА проявили образцы № 3 и 12, их результат был сопоставим с атропином. Образец № 14 в исследовании на дафниях был в 2 раза менее эффективен, чем атропин, а образец № 4 в 2,7 раза менее эффективен. Образцы № 5 и 15 обладали наименьшей активностью по предотвращению АДГА у дафний среди обследованных препаратов.

### Выводы

Таким образом, с помощью скрининга на дафниях были отобраны наиболее эффективные АВК, которые в дальнейшем можно исследовать в экспериментах на теплокровных животных.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Лудевиг Р., Лос К. *Острые отравления*. М.: Медицина, 1983:560. [Ludevig R., Los K. *Ostrye otravlenija* [Acute poisonings]. Moscow: Medicina Publ., 1983:560. (In Russian)].
2. Мелехова А.С., Петров А.Н., Беспалов А.Я., Бельская А.В., Мельникова М.В., Зацепин Э.П., Шестова Г.В., Ганеев А.А. Экспериментальная фармакотерапия судорожного синдрома при моделировании тяжелого отравления карбаматом. *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. 2019;20(2):294–306. [Melehova A.S., Petrov A.N., Bepalov A.Ja., Bel'skaja A.V., Mel'nikova M.V., Zacepin Je.P., Shestova G.V., Ganeev A.A. Jeksperimental'naja farmakoterapija sudorozhnogo sindroma pri modelirovanii tjazhjologo otravlenija karbamatom [Experimental pharmacotherapy of convulsive syndrome in the simulation of severe carbamate poisoning]. *Medline.ru. Russian biomedical journal*. 2019;20(2):294–306. (In Russian)].
3. Патент № 2714135 Российская Федерация, МПК C07D 295/03 (2006.01) A61K 31/445 (2006.01) A61P 25/08 (2006.01) A61P 21/02 (2006.01). *Гидрохлорид (1-метилпиперидин-4-ил)-2пропиленаноата, обладающий холинолитической и противосудорожной активностью*. Беспалов А.Я., Прокопенко Л.И., Горчакова Т.Л., Козлов В.К., Петров А.Н., Зайцева М.А., Мелехова А.С., Бельская А.В., Мельникова М.В., Иванов М.Б., заявитель и патентообладатель ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА — 2019137931; заявл. 22.11.2019; опубл. 12.02.2020. [Patent No. 2714135 Russian Federation, MPK C07D 295/03 (2006.01) A61K 31/445 (2006.01) A61P 25/08 (2006.01) A61P 21/02 (2006.01). *Gidrohlorid (1-metilpiperidin-4-il)-2propilentanoata, obladajushij holinoliticheskoj i protivosudorozhnoj aktivnost'ju*. [Hydrochloride of (1-methylpiperidin-4-yl)-2-propylentanoate, which has anticholinergic and anticonvulsant activity]. Bepalov A.Ja., Prokopenko L.I., Gorchakova T.L., Kozlov V.K., Petrov A.N., Zajceva M.A., Melehova A.S., Bel'skaja A.V., Mel'nikova M.V., Ivanov M.B., applicant and patent holder of the Federal State Budgetary Institution “Institute of Toxicology” FMBA — 2019137931; application 11/22/2019; publ. 02/12/2020. (In Russian)].
4. Подосиновикова Н.П., Александрова М.Л., Бондаренко А.А., Горчакова Т.Л., Беспалов А.Я., Ватаева А.А., Мастерова К.В., Журкович И.К. Скрининг холинергических фармакологических веществ на биологических тест-объектах — зоогидробионтах *Daphnia magna* Straus. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2022;85(5):3–9. [Podosinovikova N.P., Aleksandrova M.L., Bondarenko A.A., Gorchakova T.L., Bepalov A.Ja., Vataeva A.A., Masterova K.V., Zhurkovich I.K. Skriniring holinergicheskikh farmakologicheskikh veshhestv na biologicheskikh test-ob'ektah — zoogidrobiontah *Daphnia magna* Straus [Screening of cholinergic drugs using *Daphnia magna* Straus hydro-

- bionts as biological test objects]. *J. of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2022;85(5):3–9. (In Russian)].
5. Подосиновикова Н.П., Космачев А.Б., Тонкопий В.Д., Загребин А.О., Евдокимова Е.А., Малов А.М., Петров В.В., Долго-Сабуров В.Б. *Daphnia magna* Straus как объект при исследовании препаратов холинергического типа действия. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;65(1):73–74. [Podosinovicova N.P., Aleksandrova M.L., Bondarenko A.A., Gorchakova T.L., Bepalov A.Ja., Vataeva A.A., Masterova K.V., Zhurkovich I.K. Skrining holinerghicheskikh farmakologicheskikh veshhestv na biologicheskikh test-ob'ektah — zoogidrobiontah *Daphnia magna* Straus [Screening of cholinergic drugs using *Daphnia magna* Straus hydrobionts as biological test objects. *J. of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2022;85(5):3–9. (In Russian)].
  6. ФР.1.39.2007.003222, «Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний». М.: АКВАРОС, 2007. [FR.1.39.2007.003222, “Metodika opredelenija toksichnosti vody i vodnyh vytyazhek iz pochv, osadkov stochnyh vod, othodov po smertnosti i izmeneniju plodovitosti dafnij” [“Methodology for determining the toxicity of water and water extracts from soils, sewage sludge, waste by mortality and changes in the fertility of *Daphnia*”]. Moscow: AKVAROS Publ., 2007. (In Russian)].
  7. Ren Z., Zhang X., Wang X., Qi P., Zhang B., Zeng Y., Fu R., Miao M. AChE inhibition: One dominant factor for swimming behavior changes of *Daphnia magna* under DDVP exposure. *Chemosphere*. 2015:252–257.
  8. Tkaczyk A., Bownik A., Dudka J., Kowal K., Ślaska B. *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of the Total Environment*. 2021;763:1–18.

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Бондаренко Анастасия Александровна\***, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России;

**e-mail:** [bondarenko-nastua@yandex.ru](mailto:bondarenko-nastua@yandex.ru)

**Anastasiya A. Bondarenko\***, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

**e-mail:** [bondarenko-nastua@yandex.ru](mailto:bondarenko-nastua@yandex.ru)

**Мелехова Александра Сергеевна**, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

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

**Aleksandra S. Melehoa**, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

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

**Беспалов Александр Яковлевич**, к.х.н., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

**e-mail:** [albsp2011@yandex.ru](mailto:albsp2011@yandex.ru)

**Aleksandr Ya. Bepalov**, Cand. Sci. (Chem.), Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

**e-mail:** [albsp2011@yandex.ru](mailto:albsp2011@yandex.ru)

**Горчакова Татьяна Леонидовна**, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

**e-mail:** [albsp2011@yandex.ru](mailto:albsp2011@yandex.ru)

**Tat'jana L. Gorchakova**, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

**e-mail:** [albsp2011@yandex.ru](mailto:albsp2011@yandex.ru)

**Прокопенко Любовь Ивановна**, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»;

**e-mail:** [albsp2011@yandex.ru](mailto:albsp2011@yandex.ru)

**Ljubov' I. Prokopenko**, Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

**e-mail:** [albsp2011@yandex.ru](mailto:albsp2011@yandex.ru)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ВЛИЯНИЕ НАНОФОРМЫ 9-ФЕНИЛ-2,3,4,5,6,7,8,9-ОКТАГИДРО-1Н-СЕЛЕНОКСАНТЕНА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ БЕЛЫХ КРЫС

О.В. Буюклинская<sup>1,\*</sup>, С.М. Напалкова<sup>1</sup>, Е.Д. Кубасова<sup>2</sup>, Д.С. Макарова<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России  
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России  
163000, Российская Федерация, Архангельск, пр. Троицкий, 51

<sup>3</sup> ООО «Максавит»  
163001, Российская Федерация, Архангельск, пр. Троицкий, 121, к. 3

Несмотря на современные методы лечения, частота бесплодия как в мире, так и в России остается высокой. В экспериментальном исследовании изучалось влияние нанопрепарата, содержащего производное селеноксантина и циклодекстрин, на репродуктивность белых беспородных крыс-самок после введения мифепристона. Селеноксантин в дозах 0,35 и 0,7 мг/кг при внутрижелудочном введении в течение 5 дней повышал репродуктивность животных.

**Ключевые слова:** репродуктивность, белые беспородные крысы, производное селеноксантина, мифепристон

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

**Для цитирования:** Буюклинская О.В., Напалкова С.М., Кубасова Е.Д., Макарова Д.С. Влияние наноформы 9-фенил-2,3,4,5,6,7,8,9-октагидро-1Н-селеноксантина на репродуктивную функцию белых крыс. *Биомедицина*. 2023;19(3E):85–89. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-85-89>

Поступила 05.04.2023

Принята после доработки 11.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## INFLUENCE OF A NANOFORM OF 9-PHENYL-2,3,4,5,6,7,8,9-OCTAHYDRO-1H-SELENOXANTHENE ON THE REPRODUCTIVE FUNCTION OF WHITE RATS

Olga V. Buyuklinskaya<sup>1,\*</sup>, Svetlana M. Napalkova<sup>1</sup>, Elena D. Kubasova<sup>2</sup>,  
Daria S. Makarova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professora Popova str., 14, lit. A

<sup>2</sup> Northern State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia  
163000, Russian Federation, Arkhangelsk, Troitskiy Ave., 51

<sup>3</sup> Maksavit  
163001, Russian Federation, Arkhangelsk, Troitskiy Ave., 121/3

Despite the diversity of modern treatment methods, infertility rates remain high both in Russian and globally. In the present experimental study, we study the effect of a nanopreparation based on a selenoxanthene derivative and cyclodextrin on the reproduction of white outbred rats (females) after the administration of

mifepristone. Selenoxanthene at a dose of 0.35 mg/kg and 0.7 mg/kg intragastrically for 5 days increased the reproductive activity of animals.

**Keywords:** reproduction, white outbred rats, selenoxanthene derivative, mifepristone

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

**For citation:** Buyuklinskaya O.V., Napalkova S.M., Kubasova E.D., Makarova D.S. Influence of a Nanoform of 9-phenyl-2,3,4,5,6,7,8,9-octahydro-1H-selenoxanthene on the Reproductive Function of White Rats. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):85–89. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-85-89>

Submitted 05.04.2023

Revised 11.05.2023

Published 06.11.2023

## Введение

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, частота бесплодия в мире составляет 10–15%, а в России колеблется от 17,2 до 24% в различных регионах [1, 5]. Несмотря на применение новых групп лекарственных средств, в т.ч. прямых и непрямых стимуляторов овуляции, бесплодие недостаточно эффективно поддается лечению [4]. В связи с этим поиск препаратов для лечения ановуляторного бесплодия является актуальной задачей. В последние годы проведено множество исследований, демонстрирующих взаимосвязь бесплодия женщин и уровня селена в организме: дефицит селена у женщин может приводить к нарушению месячного цикла, угрозе прерывания беременности, бесплодию [2].

Органическое соединение селена — 9-фенил-2,3,4,5,6,7,8,9-октагидро-1H-селеноксантен (селеноксантен) — отличается от неорганических соединений (селената и селенита натрия) выраженным антиоксидантным действием, лучшей аккумуляцией, способностью активировать деятельность иммунной и детоксикационной систем, меньшей токсичностью [3]. Влияние селеноксантена на фертильность описано лишь в отдельных экспериментальных работах. В связи с этим **целью** настоящего исследования было изучить влияние наноформы селеноксантена на репродуктивную функ-

цию крыс с предварительным введением мифепристона.

## Материалы и методы

Наноформа субстанции 9-фенил-2,3,4,5,6,7,8,9-октагидро-1H-селеноксантена в комплексе с циклодекстрином была предоставлена для исследования ООО «Научно-исследовательский центр “Парк активных молекул”», г. Обнинск.

Влияние селеноксантена на репродуктивную функцию изучали на белых беспородных крысах-самках массой 220±20 г. Исследование выполнено в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» (Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 81). Все манипуляции, причиняющие животным боль, проводили под общим обезболиванием этиналом натрия (40 мг/кг, внутривенно).

При исследовании острой токсичности крыс выводили с использованием анестетика.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программного обеспечения STATA (Stata Corp, TX, USA).

Животные были распределены на группы (табл. 1).

После введения препаратов в клетки с самками (размещение по 5 особей)

**Таблица 1.** Распределение животных по группам

**Table 1.** Distribution of animals by groups

1 группа (n=10)	2 группа (n=10)	3 группа (n=10)	4 группа (n=10)
Контроль, оливковое масло 1 мл в течение 5 дней внутрижелудочно	Контроль, мифепристон в дозе 2 мг / 100 г в течение 7 дней внутрижелудочно	Мифепристон в дозе 2 мг / 100 г, а затем селеноксантин в дозе 0,35 мг/кг, суспензия в оливковом масле внутрижелудочно	Мифепристон в дозе 2 мг / 100 г, а затем селеноксантин в дозе 0,7 мг/кг, суспензия в оливковом масле внутрижелудочно

**Таблица 2.** Влияние селеноксантина на репродуктивность белых крыс после введения мифепристона

**Table 2.** The effect of selenoxanthene on the reproduction of white rats after the administration of mifepristone

Показатели	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
Всего самок	10	10	10	10
Обсемененных*	10	8	10	10
Беременных	10	8	10	10
Количество потомства в группе	47	67	72	59
Средняя величина помета	4,5	6,2	7,1	5,9
Живорожденные	45	62	71	59
Мертворожденные	2	5	1**	0**
Индекс плодовитости, %	100	100	100	100
Индекс беременности, %	100	80	100	100

**Примечание:** \* — исходя из количества беременных самок; \*\* —  $p < 0,05$ .

**Note:** \* — based on the number of pregnant females; \*\* —  $p < 0.05$ .

на 14 дней подсаживали крыс-самцов из расчета 1 самец на 5 самок. При появлении внешних признаков беременности (у самок увеличивалась округлость живота, наблюдался усиленный рельеф сосков и поведенческие особенности) подсчитывали количество беременных самок. Через 20–25 дней самки воспроизводили потомство. Фиксировали общее количество потомства в группе, среднюю величину помета, количество мертво- и живорожденных крысят, рассчитывали индекс беременности и индекс плодовитости.

Индекс беременности в группе:

$$\% = \frac{N1}{N2} \times 100\%,$$

где N1 — количество беременных самок; N2 — количество оплодотворенных самок.

Индекс плодовитости в группе:

$$\% = \frac{N1}{N2} \times 100\%,$$

где N1 — количество оплодотворенных самок, N2 — количество ссаженных самок.

## Результаты и их обсуждение

В ходе данной работы было выявлено, что селеноксантин в дозе 0,35 и 0,7 мг/кг при введении внутрижелудочно в течение 5 дней повышал частоту наступления беременностей у крыс после введения мифепристона (табл. 2). Средняя величина помета и количество живорожденных в помете не имели достоверных различий от контроля. Количество мертворожденных в помете в группе животных, получавших исследуемый препарат в дозе 0,35 и 0,7 мг/кг, было ниже по сравнению с аналогичным параметром в группе животных, получавших мифепристон ( $p < 0,05$ ).

Оценка полученных данных показала, что применение наноформы селеноксантина в дозе 0,35 и 0,7 мг/кг после предварительного введения мифепристона



не влияло на плодовитость в группах 3 и 4 по сравнению с показателями в интактной группе и группе животных, получавших только антагонист прогестерона. Продолжительность беременности в 3 и 4 группах не отличалась от показателей в контрольных группах. Индекс беременности в группах 3 и 4 был выше по сравнению с группой животных, получавших мифепристон, на 20%. Количество потомства

в пометах не имело достоверных различий, но количество мертворожденных плодов в группах 3 и 4 было достоверно меньше по сравнению с группой 2 ( $p < 0,05$ ).

## Выводы

Селеноксантен в дозе 0,35 и 0,7 мг/кг повышает репродуктивную функцию белых крыс после применения мифепристона.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Даржаев З.Ю. Частота бесплодия в браке среди городского и сельского населения Республики Бурятия: результаты популяционного исследования. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2017;2(4):14–21. [Darzhaev Z.Yu. Chastota besplodiya v brake sredi gorodskogo i sel'skogo naseleniya Respubliki Buryatiya: rezul'taty populyatsionnogo issledovaniya [The frequency of infertility in marriage among the urban and rural population of the Republic of Buryatia: results of a population study]. *Fundamental and clinical medicine*. 2017;2(4):14–21. (In Russian)].
2. Ших Е.В., Махова А.А., Еременко Н.Н. Полиненасыщенные жирные кислоты и селен как необходимые компоненты микронутриентной поддержки в период беременности. *РМЖ. Мать и дитя*. 2017;2:126–131. [Shikh E.V., Makhova A.A., Eremenko N.N. Polinenasyshchennyye zhirnyye kisloty i selen kak neobkhodimyye komponenty mikro-nutriyentnoy podderzhki v period beremennosti [Polyunsaturated fatty acids and selenium as necessary components of micronutrient support during pregnancy]. *RMZH. Mat' i ditya* [Russian Medical Journal. Mother and child]. 2017;2:126–131. (In Russian)].
3. Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., Трухан И.С., Шурыгин М.Г. Селен в наноформе: токсичность и безопасность. *Байкальский медицинский журнал*. 2022;1(1):24–32. [Shurygina I.A., Dremina N.N., Trukhan I.S., Shurygin M.G. Selen v nanoforme: toksichnost' i bezopasnost'. [Selenium in nanoform: toxicity and safety]. *Baykal'skiy meditsinskiy zhurnal* [Baikal Medical Journal.] 2022;1(1):24–32. (In Russian)]. DOI: 10.57256/2949-0715-2022- 1-1-24-32.
4. Ayeleke R.O., Brown J., Lam W.S., Broekmans F.J. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane database Syst. Rev.* 2016;4:CD001750.
5. Yen C.F., Kim M.R., Lee C.L. Epidemiologic Factors Associated with Endometriosis in East Asia. *Gynecol. Minim. Invasive Ther.* 2019;8(1):4–11. DOI: 10.4103/GMIT.GMIT\_83\_18.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Буюклинская Ольга Владимировна\***, д.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;  
**e-mail: [olga.buyklinskaya@pharminnotech.com](mailto:olga.buyklinskaya@pharminnotech.com)**

**Olga V. Buyuklinskaya\***, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
**e-mail: [olga.buyklinskaya@pharminnotech.com](mailto:olga.buyklinskaya@pharminnotech.com)**

**Напалкова Светлана Михайловна**, д.б.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;  
**e-mail: [svetlana.napalkova@pharminnotech.com](mailto:svetlana.napalkova@pharminnotech.com)**

**Svetlana M. Napalkova**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
**e-mail: [svetlana.napalkova@pharminnotech.com](mailto:svetlana.napalkova@pharminnotech.com)**

**Кубасова Елена Дмитриевна**, к.б.н., ФГБОУ  
ВО «Северный государственный медицинский  
университет» Минздрава России;  
e-mail: [lapkino@mail.ru](mailto:lapkino@mail.ru)

**Elena D. Kubasova**, Cand. Sci. (Biol.), Northern  
State Medical University of the Ministry of Health  
Care of Russia;  
e-mail: [lapkino@mail.ru](mailto:lapkino@mail.ru)

**Макарова Дарья Сергеевна**, ООО «Максавит»;  
e-mail: [Liaka12@mail.ru](mailto:Liaka12@mail.ru)

**Daria S. Makarova**, Maksavit;  
e-mail: [Liaka12@mail.ru](mailto:Liaka12@mail.ru)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



## ПЕПТИД HLDF-6-Н ПРОЯВЛЯЕТ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРИ РАЗВИТИИ ДЕПРЕССИИ НА МФТП МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

С.А. Зозуля<sup>1\*</sup>, О.Ю. Соколов<sup>1</sup>, Н.В. Кост<sup>1</sup>, Н.В. Баймеева<sup>1</sup>, А.К. Дадаян<sup>2</sup>,  
Ю.А. Золотарев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»  
115522, Российская Федерация, Москва, Каширское ш., 34

<sup>2</sup> ФГБНУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»  
123182, Российская Федерация, Москва, пл. Академика Курчатова, 2

Цель работы — выяснение противовоспалительного действия пептида HLDF-6-Н (Thr-Gly-Glu-Hse-His-Arg), являющегося биоактивным фрагментом фактора дифференцировки лейкоцитов HLDF, на модели досимптомной стадии болезни Паркинсона (БП).

В исследовании использована модель досимптомной стадии БП, основанная на введении мышам C57Bl/6 умеренных доз токсина МФТП. HLDF-6-Н вводили интраназально в дозе 300 мкг/кг ежедневно в течение 3 недель. Выраженность депрессии определяли по времени иммобилизации в тесте Порсолта. В сыворотке крови с помощью MS-анализа определяли уровень 10 стероидов. Активность маркеров воспаления лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) и  $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора ( $\alpha 1$ -ПИ) определяли с помощью кинетических методов.

О развитии воспалительного процесса под действием МФТП свидетельствует повышение активности  $\alpha 1$ -ПИ, противовоспалительное действие пептида выражается в снижении активности ЛЭ и  $\alpha 1$ -ПИ. При этом время иммобилизации мышей в тесте Порсолта положительно коррелировало с  $\alpha 1$ -ПИ и ЛЭ, что может свидетельствовать о роли воспаления в процессе развития депрессии. На общей выборке мышей обнаружена положительная корреляция между эстрадиолом и ЛЭ. В группе мышей, получавших пептид,  $\alpha 1$ -ПИ положительно коррелировал с кортикостероном и отрицательно с эстрадиолом и андростендионом. Можно предположить, что противовоспалительное действие пептида связано с регуляцией кортикостероидов и половых гормонов.

Таким образом, в использованной экспериментальной модели досимптомной стадии БП наблюдается развитие патологии в виде депрессивно-подобного синдрома и нейроэндокринных нарушений. Хроническое применение HLDF-6-Н оказывает антидепрессивное и противовоспалительное действие.

**Ключевые слова:** модели болезни Паркинсона, пептид HLDF-6, тест Порсолта, нейровоспаление, лейкоцитарная эластаза, стероиды

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

**Финансирование:** работа частично поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума Российской академии наук, проект № 01201353020.

**Для цитирования:** Зозуля С.А., Соколов О.Ю., Кост Н.В., Баймеева Н.В., Дадаян А.К., Золотарев Ю.А. Пептид HLDF-6-Н проявляет противовоспалительное действие при развитии депрессии на МФТП модели болезни Паркинсона. *Биомедицина*. 2023;19(3E):90–94. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-90-94>

Поступила 24.04.2023

Принята после доработки 23.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## HLDF-6-H PEPTIDE EXHIBITS AN ANTI-INFLAMMATORY EFFECT IN THE DEVELOPMENT OF DEPRESSION IN AN MPTP MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

Svetlana A. Zozulya<sup>1,\*</sup>, Oleg Yu. Sokolov<sup>1</sup>, Natalia V. Kost<sup>1</sup>, Natalia V. Baimeeva<sup>1</sup>,  
Alexandr K. Dadayan<sup>2</sup>, Yuriy A. Zolotarev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mental Health Research Center  
115522, Russian Federation, Moscow, Kashirskoe Highway, 34

<sup>2</sup> National Research Center "Kurchatov Institute"  
123182, Russian Federation, Moscow, Akademika Kurchatova Square, 2

In this work, we investigate the anti-inflammatory effect of the HLDF-6-H peptide (Thr-Gly-Glu-Hse-His-Arg) in a model of the presymptomatic stage of Parkinson's disease (PD). This peptide is a bioactive fragment of the HLDF leukocyte differentiation factor. The presymptomatic stage of PD was modelled by introducing moderate doses of MPTP toxin to C57Bl/6 mice. HLDF-6-H was administered intranasally at a dose of 300 µg/kg daily for three weeks. The severity of depression was determined by the time of immobilization in a Porsolt test. The serum levels of 10 steroids were determined using MS analysis. The activity of inflammatory markers leukocyte elastase (LE) and  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor ( $\alpha$ 1-PI) was determined using kinetic methods. The development of an inflammatory process under the influence of MPTP is evidenced by an increase in the activity of  $\alpha$ 1-PI; the anti-inflammatory effect of the peptide is manifested in a decreased activity of LE and  $\alpha$ 1-PI. At the same time, the immobilization time of mice in a Porsolt test positively correlated with  $\alpha$ 1-PI and LE, which may indicate the role of inflammation in the development of depression. A positive correlation between estradiol and LE was found in the general sample of mice. In the group of mice treated with the peptide,  $\alpha$ 1-PI correlated positively with corticosterone and negatively with estradiol and androstenedione. It can be assumed that the anti-inflammatory effect of the peptide is associated with the regulation of corticosteroids and sex hormones. Hence, the applied experimental model confirmed the development of a depressive-like syndrome and neuroendocrine disorders in the presymptomatic stage of PD. The long-term use of HLDF-6-H has antidepressant and anti-inflammatory effects.

**Keywords:** Parkinson's disease models, HLDF-6 peptide, Porsolt test, neuroinflammation, leukocyte elastase, steroids

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

**Funding:** the study was partially supported by the Program for Basic Research of the Presidium of the Russian Academy of Sciences, project No. 01201353020.

**For citation:** Zozulya S.A., Sokolov O.Yu., Kost N.V., Baimeeva N.V., Dadayan A.K., Zolotarev Yu.A. HLDF-6-H Peptide Exhibits an Anti-inflammatory Effect in the Development of Depression in an MPTP Model of Parkinson's Disease. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):90–94. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-90-94>

Submitted 24.04.2023

Revised 23.05.2023

Published 06.11.2023

### Введение

Известно, что в этиологии и течении болезни Паркинсона (БП) существенную роль играет окислительный стресс, возникающий в результате дисбаланса между уровнями активных оксидантов и антиоксидантов и приводящий к нейровоспа-

лению. Характерной чертой развития БП является активация микроглии и усиление продукции хемокинов, цитокинов, белков острой фазы и других медиаторов воспаления. На МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) модели БП установлено, что развитие патологического процесса

сопровождается изменением уровней цитокинов воспаления в тканях мозга и стероидных гормонов в сыворотке крови [4].

Установлено, что воспалительные реакции при органических непсихотических расстройствах непосредственно связаны с лейкоцитарной эластазой (ЛЭ),  $\alpha$ 1-протеиназным ингибитором ( $\alpha$ 1-ПИ), являющимися факторами врожденного и адаптивного иммунитета [1]. Излишняя активность ЛЭ может приводить к повреждению эндотелия сосудов мозга и вторичным метаболическим повреждениям. Основным регулятором активности ЛЭ является  $\alpha$ 1-ПИ, который относится к белкам острой фазы, синтезирующимся в печени. Соотношение протеаз и их ингибиторов, т.н. «протеазно-ингибиторный индекс» (ПИИ), характеризует активность воспалительных реакций и в большой мере определяет их направленность на ослабление или усиление деструктивного процесса.

Современная терапия БП направлена на лечение последствий дегенерации дофаминовых нейронов, а не на неотъемлемую причину заболевания. Потенциальным кандидатом на роль нетоксичного и высокоэффективного препарата является пептид HLDF-6-N (Thr-Gly-Glu-Hse-His-Arg), гомосериновое производное фрагмента 41–46 фактора дифференцировки лейкоцитов человека HLDF [3]. Также было показано, что HLDF-6-N снижает вызванные старением воспалительные реакции у старых крыс.

**Целью исследования** явилось выяснение противовоспалительного действия пептида HLDF-6-N на МФТП модели досимптомной стадии БП.

### Материалы и методы

Пептид HLDF-6-N был синтезирован классическим твердофазным методом с использованием Boc/Bzl-процедуры в ООО «Synton-Lab».

В исследовании использована модель досимптомной стадии БП, основанная на введении мышам умеренных доз токсина МФТП. Исследовали 38 мышей-самцов линии C57Bl/6 в возрасте 7–8 недель массой 22–23 г, полученных из Филиала «Столбовая» ФГБУН НЦМБТ ФМБА России (Московская обл.). Мышей содержали по 6–7 животных в клетке со свободным доступом к воде и пище при 21°C с использованием 12/12-часового цикла свет/темнота. Животные были случайным образом разделены на 3 группы. Мыши группы «Токсин» (13 мышей) и «Пептид» (12 мышей) получали двукратно внутрибрюшинно МФТП в дозе 18 мг/кг с интервалом 2 ч в объеме 200 мкл, а мышам группы «Контроль» вводили физ. р-р (ФР) в том же объеме. Лечение HDLF-6-N начинали через 1 ч после введения токсина. Пептид вводили интраназально в дозе 300 мкг/кг в объеме 6 мкл ежедневно в течение 3 недель. Животным из групп «Контроль» и «Токсин» интраназально вводили ФР.

Еженедельно тестировали время иммобилизации мышей при принудительном плавании (ПП, тест Порсолта) в воде комнатной температуры в течение 5 мин. По окончании эксперимента животных декапитировали под эфирным наркозом. Кровь собирали у животных сразу после их декапитации. Сыворотку отделяли центрифугированием и хранили при –80°C до анализа.

В сыворотке крови с помощью MS-анализа определяли уровень 10 стероидов, включая тестостерон, эстрадиол, прогестерон и кортикостерон. Активность ЛЭ и  $\alpha$ 1-ПИ определяли по скорости гидролиза субстрата ВОС (ВОС-Ala-ONp) и по степени торможения БАЕЕ-эстеразной активности трипсина [2].

### Результаты и их обсуждение

Тест ПП показал, что через 3 недели после введения токсина у мышей развивается

депрессивноподобный синдром, который блокируется пептидом HLDF-6-Н. Время иммобилизации мышей в 1,5 раза повышается под действием токсина и снижается практически до уровня контроля после хронического введения пептида ( $141 \pm 17$ ,  $204 \pm 20$  и  $172 \pm 11$  сек в группах «Контроль», «Токсин» и «Пептид» соответственно,  $p < 0,05$ ). При тестировании на первой и второй неделях после введения токсина подобных отличий не наблюдалось. Активность ЛЭ в сыворотке крови отражает функциональную активность нейтрофилов. Токсин не повлиял на этот параметр ( $6,8 \pm 0,1$  нмоль/мин·л в группах «Контроль» и «Токсин»), а введение пептида снизило активность ЛЭ до  $6,4 \pm 0,1$  нмоль/мин·л ( $p < 0,05$ ). Содержание белка острой фазы воспаления  $\alpha 1$ -ПИ повысилось после введения токсина с  $71 \pm 4,5$  до  $91 \pm 4,5$  ИЕ/мл ( $p < 0,05$ ), а в группе мышей, получавших пептид, этот параметр достоверно не отличался от контроля ( $85 \pm 5$  ИЕ/мл). Соотношение этих параметров, отражающее активность протеолитической системы воспаления (ППИ), снизилось под действием токсина ( $101 \pm 8$ ;  $77 \pm 4$  и  $79 \pm 6$  в группах «Контроль», «Токсин» и «Пептид» соответственно,  $p < 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о развитии воспалительного процесса под действием МФТП и противовоспалительном действии пептида. Корреляционный анализ показал, что время иммобилизации мышей в тесте ПП на 3-й, но не на 1-й неделе положительно коррелировало с  $\alpha 1$ -ПИ ( $r = +0,48$ ;  $p = 0,002$ ). Положительная корреляция на-

блюдалась и между пассивным плаванием мышей на 2-й неделе и ЛЭ ( $r = +0,7$ ;  $p = 0,02$ ), что может свидетельствовать о роли воспаления в процессе развития депрессии.

В использованной модели наблюдалось обратимое пептидом снижение уровня эстрадиола ( $26 \pm 4$ ;  $19 \pm 1$  и  $24 \pm 3$  пг/мл в группах «Контроль», «Токсин» и «Пептид» соответственно,  $p < 0,05$ ) и кортизола ( $1,52 \pm 0,26$ ;  $0,88 \pm 0,09$  и  $1,24 \pm 0,19$  нмоль/л в группах «Контроль», «Токсин» и «Пептид» соответственно,  $p < 0,05$ ). Уровень андростендиона снижался под действием пептида ( $0,51 \pm 0,06$ ;  $0,54 \pm 0,10$  и  $0,33 \pm 0,05$  нмоль/л в группах «Контроль», «Токсин» и «Пептид» соответственно,  $p < 0,05$ ). При этом на общей выборке мышей обнаружена положительная корреляция между эстрадиолом и ЛЭ ( $r = 0,58$ ;  $p = 0,04$ ). В группе мышей, получавших пептид,  $\alpha 1$ -ПИ положительно коррелировал с кортикостероном ( $r = +0,62$ ;  $p = 0,033$ ) и отрицательно — с эстрадиолом ( $r = -0,70$ ;  $p = 0,01$ ) и андростендионом ( $r = -0,71$ ;  $p = 0,009$ ). Предполагается, что противовоспалительное действие пептида связано с регуляцией кортикостероидов и половых гормонов.

## Выводы

В использованной экспериментальной модели наблюдается развитие патологии в виде депрессивно-подобного синдрома, нейроэндокринных нарушений и активации воспалительных реакций. Курсовое применение HLDF-6-Н оказывает антидепрессивное и противовоспалительное действие.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Андросова Л.В., Ветлугина Т.П., Никитина В.Б., Зозуля С.А., Отман И.Н., Белокрылова М.Ф., Ключник Т.П. Воспалительные маркеры при органических непсихотических расстройствах. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2023;123(3):88–93. [Androsova L.V., Vetlugina T.P., Nikitina V.B., Zozulya S.A., Otman I.N., Belokrylova M.F., Klyushnik T.P. Vospalitel'nye markery pri organicheskikh nepsihoticheskikh rasstrojstvakh [Inflammatory markers in organic nonpsychotic disorders]. *S.S. Korsakov J. of Neurology and Psychiatry*. 2023;123(3):88–93. (In Russian)]. DOI: 10.17116/jnevro202312303188.
2. Зозуля С.А., Тихонов Д.В., Каледа В.Г., Ключник Т.П. Иммуновоспалительные маркеры становления ремиссии после первого психотического приступа

- в юношеском возрасте. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2021;121(6): 59–66. [Zozulya S.A., Tikhonov D.V., Kaleda V.G., Klyushnik T.P. Immunovospalitel'nye markery stanovleniya remissii posle pervogo psihoticheskogo pristupa v yunosheskom vozraste. [Immunoinflammatory markers of remission formation after the first psychotic attack in adolescence]. *S.S. Korsakov J. of Neurology and Psychiatry*. 2021;121(6):59–66. (In Russian)]. DOI: 10.17116/jnevro202112106159.
3. Sokolov O.Yu., Prokhorova T.A., Tereshkina E.B., Zozulya S.A., Simonov A.N., Kost N.V., Dadayan A.K., Bogachouk A.P., Zolotarev Yu.A. Neurotropic peptide HLDF-6-amide reduces age-related decline in sexual activity in old male rats. *Experimental Gerontology*. 149,2021;111329. DOI: 10.1016/j.exger.2021.111329.
4. Zolotarev Yu.A., Shram S.I., Dadayan A.K., Dolotov O.V., Markov D.D., Nagaev I.Yu., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Sokolov O.Yu., Kost N.V. HLDF-6 peptides exhibit neuroprotective effects in the experimental model of preclinical Parkinson's disease. *Neuropeptides*. 2022;96:10228715. DOI: 10.1016/j.npep.2022.102287.

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Зозуля Светлана Александровна\***, к.б.н., ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»;  
e-mail: [s.ermakova@mail.ru](mailto:s.ermakova@mail.ru)

**Svetlana A. Zozulya\***, Cand. Sci. (Biol.), Mental Health Research Center;  
e-mail: [s.ermakova@mail.ru](mailto:s.ermakova@mail.ru)

**Соколов Олег Юрьевич**, д.б.н., ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»;  
e-mail: [oleg-sokolov@yandex.ru](mailto:oleg-sokolov@yandex.ru)

**Oleg Yu. Sokolov**, Dr. Sci. (Biol.), Mental Health Research Center;  
e-mail: [oleg-sokolov@yandex.ru](mailto:oleg-sokolov@yandex.ru)

**Кост Наталия Викторовна**, д.б.н., проф., ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»;  
e-mail: [nat-kost@yandex.ru](mailto:nat-kost@yandex.ru)

**Natalia V. Kost**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Mental Health Research Center;  
e-mail: [nat-kost@yandex.ru](mailto:nat-kost@yandex.ru)

**Баймеева Наталия Викторовна**, к.б.н., ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»;  
e-mail: [baymeeva\\_n@mail.ru](mailto:baymeeva_n@mail.ru)

**Natalia V. Baimeeva**, Cand. Sci. (Biol.), Mental Health Research Center;  
e-mail: [baymeeva\\_n@mail.ru](mailto:baymeeva_n@mail.ru)

**Дадаян Александр Карэнович**, к.х.н., ФГБНУ «Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”»;  
e-mail: [dak.img.ras@gmail.com](mailto:dak.img.ras@gmail.com)

**Alexandr K. Dadayan**, Cand. Sci. (Chem.), National Research Center “Kurchatov Institute”;  
e-mail: [dak.img.ras@gmail.com](mailto:dak.img.ras@gmail.com)

**Золотарев Юрий Александрович**, д.х.н., проф., ФГБНУ «Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”»;  
e-mail: [zolya@img.ras.ru](mailto:zolya@img.ras.ru)

**Yuriy A. Zolotarev**, Dr. Sci. (Chem.), Prof., National Research Center “Kurchatov Institute”;  
e-mail: [zolya@img.ras.ru](mailto:zolya@img.ras.ru)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ПРОПАНДИОВОЙ КИСЛОТЫ С КАРДИОТРОПНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Д.Ю. Ивкин\*, А.А. Карпов, В.Е. Ковансков, И.А. Титович

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России  
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

Представлены результаты экспериментальных исследований по изучению фармакологической безопасности фармацевтической субстанции (ФС) 4-[(3-оксо-3-этоксипропаноил)амино]бензойной кислоты (этамбен) при однократном внутрижелудочном введении в различных экспериментальных дозах (60–3000 мг/кг) самкам лабораторных аутбредных крыс. В рамках исследования проводился клинический осмотр подопытных животных с целью выявления признаков интоксикации, оценивалось потребление корма и воды, был проведен биохимический анализ крови, оценивалось состояние центральной нервной (ЦНС) и сердечно-сосудистой систем, физическая выносливость, частота дыхательных движений. Испытуемая ФС в исследованных дозах при однократном внутрижелудочном введении крысам самкам не обладала отрицательным действием на поведение животных, на показатели крови, на состояние ЦНС и сердечно-сосудистой системы.

**Ключевые слова:** фармацевтическая субстанция (ФС), этамбен, фармакологическая безопасность, доклинические испытания

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

**Для цитирования:** Ивкин Д.Ю., Карпов А.А., Ковансков В.Е., Титович И.А. Экспериментальная оценка фармакологической безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием. *Биомедицина*. 2023;19(3E):95–98. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-95-98>

Поступила 17.04.2023

Принята после доработки 12.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE PHARMACOLOGICAL SAFETY OF A NEW PROPANDIC ACID DERIVATIVE WITH A CARDIOTROPIC ACTION

Dmitry Yu. Ivkin\*, Andrew A. Karpov, Vladislav E. Kovanskov, Irina A. Titovich

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professora Popova Str., 14, Lit. A

We present the results of experimental studies into the pharmacological safety of a pharmaceutical substance 4-[(3-oxo-3-ethoxypropanoyl)amino]benzoic acid (Etmaben) under a single intragastric administration at various experimental doses (60–3000 mg/kg) to female laboratory outbred rats. A clinical examination of the experimental animals was carried out in order to identify signs of intoxication. To that end, the level of food and water consumption was assessed and biochemical blood tests were performed. In addition, the state of the central nervous and cardiovascular systems, physical endurance, and respiratory rate were assessed. The tested pharmaceutical substance in the studied doses after a single intragastric administration to female rats had no negative effect on the behavior, blood parameters, the state of the central nervous system and the cardiovascular system of experimental animals.



**Keywords:** pharmaceutical substance (PS), etmaben, pharmacological safety, preclinical trials

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

**For citation:** Ivkin D.Yu., Karpov A.A., Kovanskov V.E., Titovich I.A. Experimental Evaluation of the Pharmacological Safety of a New Propagandic Acid Derivative with a Cardiotropic Action. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):95–98. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-95-98>

Submitted 17.04.2023

Revised 12.05.2023

Published 06.11.2023

## Введение

4-[(3-этокси-3-оксопропаноил)амино]бензойная кислота (этмабен) является перспективным фармакологическим агентом, у которого ранее была выявлена кардиотропная активность на модели хронической сердечной недостаточности [1]. Был проведён полный цикл доклинических исследований, включающих, помимо фармакодинамических испытаний, оценку общей и специфической токсичности и определение основных фармакокинетических параметров на грызунах и негрызунах при различных путях введения, за исключением теста фармакологической безопасности [2].

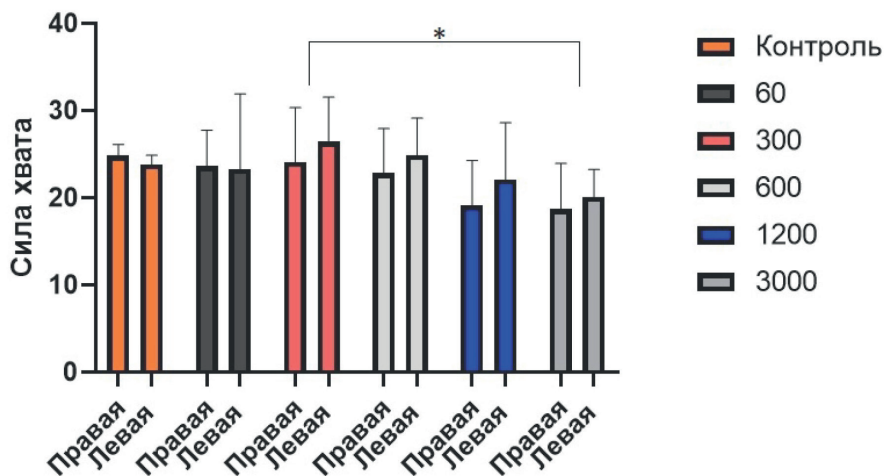
**Целью работы** являлось изучение фармакологической безопасности фармацевтической субстанции (ФС) 4-[(3-оксо-3-этоксипропаноил)амино]бензойной кислоты (этмабен) при однократном внутрижелудочном введении в различных экспериментальных дозах самкам лабораторных аутбредных крыс.

## Материалы и методы

30 самок аутбредных крыс были получены из ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская обл.), содержались в условиях 12/12-часового свето-темнового режима и получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986), Директивой

2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, ГОСТом 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» от 01.07.2016 г. Исследования были одобрены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Дизайн настоящего исследования был разработан в соответствии с ГОСТом по исследованию фармакологической безопасности. В исследовании использовались пять доз испытуемой ФС: доза, близкая к токсической, не вызывающей гибели для данного вида подопытных животных (3000 мг/кг); промежуточные дозы (1200, 600, 300 мг/кг) и минимальная доза / терапевтическая (60 мг/кг). ФС вводилась крысам однократно внутрижелудочно в виде суспензий. Животным контрольной группы аналогичным образом вводилось контрольное вещество — 1% крахмальная слизь.

Через 1 сут после введения вещества у животных была проведена оценка состояния ЦНС (тест «Открытое поле») и физической выносливости (тест на силу хвата), взята кровь для биохимического анализа (показатели АЛТ, АСТ, ЩФ). На вторые сутки после введения испытуемого вещества была снята ЭКГ (ЧСС, P, R, PQ, QT) и измерено АД, а также в состоянии наркоза проведено эхоКГ для определения таких показателей, как фракция укорочения, ЧСС и ЧДД. В данной работе более подробно представлены результаты оценки



**Рис.** Результаты теста на силу хвата. Правая и левая — правая и левая передние конечности соответственно; 60, 300, 600, 1200 и 3000 — дозы испытуемой субстанции в мг/кг; \* — различия достоверны ( $p < 0,05$ ).

**Fig.** The results of the grip strength test. Right and left are the right and left forelimbs, respectively, and 60, 300, 600, 1200 and 3000 are the doses of the test substance in mg/kg; \* — the differences are significant ( $p < 0.05$ ).

физической выносливости в рамках теста на силу хвата, который идеально подходит для оценки мышечной силы животных под влиянием гормонов, токсинов, миорелаксантов, патологических процессов и прочих факторов. Тестирование проведено с использованием системы Grip Strength Meter («TSE Systems», Германия), которая подходит для проведения экспериментов с участием крыс, мышей либо других мелких грызунов.

### Результаты исследований

Гибели на протяжении 2 сут от момента внутрижелудочного введения суспензий испытуемой ФС крысам в дозах 60, 300, 600, 1200 и 3000 мг/кг не наблюдалось.

Все крысы перенесли внутрижелудочное введение хорошо: процедура не сопровождалась какими-либо признаками недовольства, болезненности. На всех испытанных дозах клинические симптомы отравления животных отсутствовали. Визуально отличий в величинах показателей потребления

корма и воды между группами подопытных животных установлено не было.

Однократное внутрижелудочное введение крысам суспензий испытуемой ФС в исследуемом диапазоне доз не оказывало статистически значимого влияния на функциональное состояние печени, и изученные биохимические показатели находились в пределах физиологической нормы для используемого вида животных.

Значительных изменений со стороны ВНД при применении испытуемой ФС не наблюдалось.

При оценке физической выносливости крыс наблюдалось следующее: сила хвата левой и правой лап при введении доз 60, 300 и 600 мг/кг статистически значимо не изменялась, при применении доз 1200 и 3000 мг/кг наблюдалась тенденция к уменьшению силы хвата (рис.).

Проверку на нормальность осуществляли с помощью теста Шапиро–Уилка. Различия между группами определяли с помощью двухфакторного дисперсионного

анализа (Two-way ANNOVA) с поправкой Бонферрони.

Анализ показал наличие достоверных различий лишь между группами, получавшими 300 и 3000 мг/кг.

Показатели ЭКГ и АД, а также ЧСС и фракция укорочения у животных контрольных и опытных групп находились в пределах физиологической нормы.

## Выводы

Результаты исследования влияния этмабена на центральную нервную систему, сердечно-сосудистую систему, функциональное состояние печени, физическую выносливость, дыхательную систему свидетельствуют о том, что испытуемая ФС фармакологически безопасна при однократном внутривенном введении экспериментальным животным в широком диапазоне исследованных доз (60–3000 мг/кг).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

---

1. Ивкин Д.Ю., Карпов А.А., Драчева А.В. и др. Влияние производного бензойной кислоты на формирование экспериментальной хронической сердечной недостаточности. *Фармация*. 2016;63(4):49–52. [Ivkin D.Yu., Karpov A.A., Dracheva A.V., et al. Vliyaniye proizvodnogo benzojnoj kisloty` na formirovaniye e`ksperimental`noj khronicheskoy serdechnoy nedostatocnosti [Effect of a benzoic acid derivative on the development of experimental chronic heart failure]. *Pharmacy*. 2016;63(4):49–52. (In Russian)].
2. Ивкин Д.Ю., Карпов А.А. Экспериментальная оценка эффективности и безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием. *Биомедицина*. 2022;18(3):109–112. [Ivkin D.Yu., Karpov A.A. Experimental Evaluation of the Effectiveness and Safety of a New Propandic Acid Derivative Exhibiting Cardiotropic Action. *Journal Biomed*. 2022;18(3):109–112. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-18-3-109-112.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

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

**Dmitry Yu. Ivkin\***, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [dmitry.ivkin@pharminnotech.com](mailto:dmitry.ivkin@pharminnotech.com)

**Карпов Андрей Александрович**, к.м.н., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;  
e-mail: [a-karpoff@mail.ru](mailto:a-karpoff@mail.ru)

**Andrew A. Karpov**, Cand. Sci. (Med.), St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [a-karpoff@mail.ru](mailto:a-karpoff@mail.ru)

**Ковансков Владислав Евгеньевич**, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;  
e-mail: [vladislav.kovanskov@spcpu.ru](mailto:vladislav.kovanskov@spcpu.ru)

**Vladislav E. Kovanskov**, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [vladislav.kovanskov@spcpu.ru](mailto:vladislav.kovanskov@spcpu.ru)

**Титович Ирина Александровна**, к.б.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;  
e-mail: [irina.titovich@pharminnotech.com](mailto:irina.titovich@pharminnotech.com)

**Irina A. Titovich**, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [irina.titovich@pharminnotech.com](mailto:irina.titovich@pharminnotech.com)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТОВ ДИОСКОРЕИ НА ПЕРЕНОСИМОСТЬ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ ПРИ ОДНОВРЕМЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИПОКСИЧЕСКОГО И ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРОВ

А.С. Ивкина, Д.Ю. Ивкин\*, Е.Б. Шустов, М.Н. Пovyдыш

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический  
университет» Минздрава России  
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

Проведена сравнительная оценка эффективности сухих экстрактов и культуры клеток диоскореи на модели сочетанного воздействия гипоксического и температурного факторов и плавания лабораторных животных (мыши) с грузом в 10% от массы тела. Препараты диоскореи обладали выраженным термопротекторным действием и повышали физическую работоспособность, однако эффект последнего был подтвержден только для экстракта культуры клеток.

**Ключевые слова:** гемическая гипоксия, культура клеток, гипертермия, диоскорея

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

**Финансирование:** работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-14-00387 «Разработка биотехнологических подходов получения инновационных препаратов на основе культур клеток высших растений для профилактики и лечения нарушений жирового и углеводного обмена».

**Для цитирования:** Ивкина А.С., Ивкин Д.Ю., Шустов Е.Б., Пovyдыш М.Н. Оценка влияния экстрактов диоскореи на переносимость физической нагрузки при одновременном воздействии гипоксического и температурного факторов. *Биомедицина*. 2023;19(3E):99–103. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-99-103>

Поступила 20.03.2023

Принята после доработки 22.07.2023

Опубликована 06.11.2023

## INFLUENCE OF DIOSCOREA EXTRACTS ON PHYSICAL LOAD TOLERANCE IN THE SETTING OF HYPOXIC AND TEMPERATURE FACTORS

Arina S. Ivkina, Dmitry Yu. Ivkin\*, Evgeny B. Shustov, Maria N. Povydysh

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professora Popova Str., 14, Lit. A

A comparative evaluation of the effectiveness of dry alcoholic extracts of Dioscorea from pharmacopoeial raw materials and cell cultures was carried out on a model of combined exposure to hypoxic and temperature factors and swimming of laboratory animals (mice) with a load of 5% of body weight. Dioscorea preparations had a pronounced thermoprotective effect and increased physical performance; however, the aftereffect was confirmed only for the cell culture extract.

**Keywords:** hemic hypoxia, cell culture, hypothermia, hyperthermia, dioscorea

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

**Funding:** the work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 19-14-00387 “Development of biotechnological approaches to obtaining innovative drugs based on higher plant cell cultures for the prevention and treatment of disorders of fat and carbohydrate metabolism”.

**For citation:** Ivkina A.S., Ivkin D.Yu., Shustov E.B., Povydysh M.N. Influence of Dioscorea Extracts on Physical Load Tolerance in the Setting of Hypoxic and Temperature Factors. *Journal Biomed.* 2023;19(3E): 99–103. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-99-103>

Submitted 20.03.2023

Revised 22.07.2023

Published 06.11.2023

## Введение

Предпосылкой для проведения данного исследования явилось создание авторами модели оценки переносимости одновременного гипоксического и температурного воздействия на функциональное состояние организма [2] и изучение ряда фармакологических эффектов, в т.ч. антигипоксического, экстрактов диоскореи [3, 4]. В качестве интегрального показателя функционального состояния и переносимости экстремального воздействия нами была выбрана способность животных выполнять физические нагрузки (плавание с грузом).

В настоящее время организм человека часто подвергается различным экстремальным нагрузкам (отдельным или сочетанию), которые могут снижать работоспособность и выносливость. Для поддержания эффективной деятельности человека требуется фармакологическая коррекция переносимости отдельных экстремальных воздействий. Она реализуется при помощи фармакологических средств различных классов (антиоксиданты, антигипоксанты, ноотропы, адаптогены и др.) [2]. Однако иногда данные средства недостаточно эффективны, т.к. происходит привыкание организма.

**Целью работы** явилось сравнительное изучение влияния сухих экстрактов корневищ с корнями диоскореи и экстрактов каллусной культуры подземных органов диоскореи в установленной ранее дозе 100 мг/кг на продолжительность плавания при воздействии экстремальных факторов по отношению к фоновому показателю.

## Материалы и методы

Корневища с корнями диоскореи заготавливали в осенний период в питомнике лекарственных растений СПХФУ, каллусная культура подземных органов была получена в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН и депонирована во Всероссийскую коллекцию растительных клеток и органов высших растений. Сухие экстракты сырья и культуры клеток получены методом перколяции 40% этиловым спиртом с последующей лиофильной сушкой после отгона экстрагента. Исследование проведено на белых беспородных мышках-самках массой 21±2 г, полученных из ФГУП ПЛЖ «Раполово» (Ленинградская обл.). Тест-системы содержали в условиях 12/12-часового светового режима в системах искусственно вентилируемых клеток группами по 10 животных, они получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, и ГОСТом 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» от 1 июля 2016 года. Исследования были одобрены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Экстракты вводили перорально с помощью зонда с оливой на конце в выбранной экспериментальной дозе 100 мг/кг в виде растворов в воде очищен-

ной. Проводили курсовое введение в течение 5 дней, протокол исследования соответствовал описанной ранее методике [2].

Эффективность фармакологической коррекции испытуемых объектов в выбранной дозе оценивали по динамике показателя физической работоспособности — времени плавания животных с грузом в 10% от массы тела в воде комфортной температуры ( $t^{\circ}=22-24^{\circ}\text{C}$ ) и в воде с температурой  $39-41^{\circ}\text{C}$  в условиях гипоксии [1] после курсового введения экстрактов в течение 5 дней. Умеренная интенсивность гипоксического воздействия обеспечивалась внутрибрюшинным введением метгемоглобинообразователя нитрита натрия в дозе 50 мг/кг. Одной группе животных натрия нитрит вводили через 30 мин после последнего введения испытуемых объектов, а другой —

через 1 сут. В качестве контрольного плавания служило фоновое плавание животных до введения препаратов в аналогичных условиях.

В отношении всех количественных данных применяли методы описательной статистики: подсчитаны средние выборочные значения (M) и стандартные отклонения (SD). Межгрупповые различия анализировали непараметрическими методами для множественного сравнения — критерий Манна–Уитни. Различия определялись при 0,05 уровне значимости.

### Результаты исследований

В результате исследования было определено, что после курсового введения экстрактов ЛРС и культуры диоскореи животные плавали лучше, чем изначально.

**Таблица 1.** Длительность вынужденного плавания животных (с) в воде комнатной температуры при воздействии умеренной гемической гипоксии после курсового введения испытуемых объектов в дозе 100 мг/кг ( $M\pm SD$ )

**Table 1.** Duration of forced swimming of animals (sec) in water at room temperature under the influence of moderate hemic hypoxia after the course administration of test objects at a dose of 100 mg/kg ( $M\pm SD$ )

Группа	$M\pm SD$ (с) фоновая длительность	$M\pm SD$ (с) после курсового введения
Группа № 1 (экстракт ЛРС диоскореи+ $\text{NaNO}_2$ через 30 мин)	503,9 $\pm$ 140,3	846,6 $\pm$ 327,2*
Группа № 2 (экстракт ЛРС диоскореи+ $\text{NaNO}_2$ через 1 сут)	448,9 $\pm$ 139,5	444,4 $\pm$ 310,4
Группа № 3 (экстракт культуры диоскореи+ $\text{NaNO}_2$ через 30 мин)	427,3 $\pm$ 135,0	901,2 $\pm$ 430,2*
Группа № 4 (экстракт культуры диоскореи+ $\text{NaNO}_2$ через 1 сут)	362,5 $\pm$ 133,9	781,1 $\pm$ 352,8*

**Примечание:** \* — статистически значимое отличие относительно фонового значения ( $p<0,05$ ).

**Note:** \* — statistically significant difference relative to the background value ( $p<0.05$ ).

**Таблица 2.** Длительность вынужденного плавания животных (с) при воздействии умеренной гемической гипоксии в условиях гипертермии ( $t^{\circ}=39-41^{\circ}\text{C}$ ) после курсового введения испытуемых объектов в дозе 100 мг/кг ( $M\pm SD$ )

**Table 2.** The duration of forced swimming of animals (sec) under the influence of moderate hemic hypoxia in hyperthermia ( $t^{\circ}=39-41^{\circ}\text{C}$ ) after the course administration of the test objects at a dose of 100 mg/kg ( $M\pm SD$ )

Группа	$M\pm SD$ (с) фоновая длительность	$M\pm SD$ (с) после курсового введения
Группа № 1 (экстракт ЛРС диоскореи+ $\text{NaNO}_2$ через 30 мин)	254,9 $\pm$ 121,5	433,4 $\pm$ 198,7
Группа № 2 (экстракт ЛРС диоскореи+ $\text{NaNO}_2$ через 1 сут)	240,6 $\pm$ 96,8	253,1 $\pm$ 108,9
Группа № 3 (экстракт культуры диоскореи+ $\text{NaNO}_2$ через 30 мин)	242,3 $\pm$ 47,4	846,6 $\pm$ 417,4*
Группа № 4 (экстракт культуры диоскореи+ $\text{NaNO}_2$ через 1 сут)	292,9 $\pm$ 160,0	253,1 $\pm$ 108,9

**Примечание:** \* — статистически значимое отличие относительно фонового значения ( $p<0,05$ ).

**Note:** \* — statistically significant difference relative to the background value ( $p<0.05$ ).

В условиях гипоксии и гипертермии длительность плавания также увеличивалась после приема испытуемых объектов.

Результаты исследования представлены в табл. 1 и 2.

## Выводы

В условиях воздействия гипоксического стимула экстракт на основе традиционно

применяемого сырья диоскореи предсказуемо увеличивал продолжительность плавания в воде нормальной температуры сразу после курсового введения, этот эффект был менее выражен в условиях гипертермии и отсутствовало последствие, тогда как экстракт культуры клеток был эффективен во всех исследованных режимах и обладал пролонгированным эффектом.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Берзин И.А., Фокин Ю.В., Алимкина О.В. Особенности интерпретации показателей физической работоспособности лабораторных животных по показателям плавательных тестов. *Биомедицина*. 2016;4:34–46. [Karkischenko V.N., Karkischenko N.N., Shustov E.B., Berzin I.A., Fokin Yu.V., Alimkina O.V. Osobennosti interpretatsii pokazatelej fi zicheskoj rabotosposobnosti laboratornyh zhivotnyh po pokazatelyam plavatel'nyh testov [Features of interpretation of indicators of physical performance of laboratory animals according to indicators of swimming tests]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;4:34–46. (In Russian)].
2. Шустов Е.Б., Фокин Ю.В., Люблинский С.Л. и др. Фармакологическая коррекция переносимости одновременного гипоксического и температурного воздействия на функциональное состояние организма. *Биомедицина*. 2021;17(1):57–69. [Shustov E.B., Fokin Yu.V., Lyublinskij S.L., et al. Farmakologicheskaya korrektsiya perenosimosti odnovremennogo gipoksicheskogo i temperaturnogo vozdejstviya na funktsional'noe sostoyanie organizma. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(1):57–69. (In Russian)].
3. Lagunin A., Povydysh M., Ivkin D. et al. Antihypoxic Action of Panax Japonicus, Tribulus Terrestris and Dioscorea Deltoidea Cell Cultures: In Silico and Animal Studies. *Mol. Inform.* 2020;39(11):e2000093. DOI: 10.1002/minf.202000093.
4. Povydysh M.N., Titova M.V., Ivanov I.M., et al. Effect of Phytopreparations Based on Bioreactor-Grown Cell Biomass of Dioscorea deltoidea, Tribulus terrestris and Panax japonicus on Carbohydrate and Lipid Metabolism in Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients*. 2021;13(11):3811. DOI: 10.3390/nu13113811.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Ивкина Арина Сергеевна**, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;  
e-mail: [arina.ivkina@pharminnotech.com](mailto:arina.ivkina@pharminnotech.com)

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

**Шустов Евгений Борисович**, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;  
e-mail: [shustov-msk@mail.ru](mailto:shustov-msk@mail.ru)

**Arina S. Ivkina**, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [arina.ivkina@pharminnotech.com](mailto:arina.ivkina@pharminnotech.com)

**Dmitry Yu. Ivkin\***, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [dmitry.ivkin@pharminnotech.com](mailto:dmitry.ivkin@pharminnotech.com)

**Evgeny B. Shustov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [shustov-msk@mail.ru](mailto:shustov-msk@mail.ru)

**Пovyдыш Мария Николаевна**, д.б.н., проф.,  
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государст-  
венный химико-фармацевтический универси-  
тет» Минздрава России;  
**e-mail:** [maria.povydysh@pharminnotech.com](mailto:maria.povydysh@pharminnotech.com)

**Maria N. Povydysh**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., St.  
Petersburg State Chemical and Pharmaceutical  
University of the Ministry of Health Care of Russia;  
**e-mail:** [maria.povydysh@pharminnotech.com](mailto:maria.povydysh@pharminnotech.com)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author





## РАЗРАБОТКА И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫХ ПОРИСТЫХ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ С БИОАКТИВНЫМИ ПОКРЫТИЯМИ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

П.А. Каралкин<sup>1,\*</sup>, К.Г. Кудрин<sup>1,2</sup>, Д.С. Святославов<sup>1</sup>, Д.А. Усатов<sup>1</sup>, И.В. Решетов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»  
Минздрава России (Сеченовский Университет)

119991, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

<sup>2</sup> Академия постдипломного образования

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр ФМБА России»

125371, Российская Федерация, Москва, Волоколамское ш., 91

Разработана технология создания персонализированных пористых титановых имплантатов с биоактивными покрытиями, изготавливаемых с применением аддитивных технологий. Этапы создания имплантата включают получение первичных данных из области костного дефекта с помощью компьютерной томографии; 3D-моделирование области дефекта и соответствующего ей имплантата; изготовление персонализированного имплантата из титановых сплавов с использованием технологии селективного лазерного сплавления; нанесение биоактивных покрытий. Создаваемый персонализированный имплантат может иметь несколько функциональных структур. Проведены всесторонние испытания образцов титановых имплантатов с биоактивными покрытиями. Математическое моделирование и технические испытания позволили установить соответствие механических свойств разработанных структур натуральной костной ткани. Испытания *in vitro* показали отсутствие острой токсичности при высоких показателях биосовместимости исследованных образцов. Одобренные локальными этическими комитетами испытания *in vivo* на кроликах породы Советская шиншилла и обезьянах вида павиан анубис показали адекватные биомеханические и высокие остеоиндуктивные свойства исследованных образцов. Успешные результаты доклинических исследований, а также проведение токсикологических и технических испытаний в сертифицированных лабораториях позволили сформировать регистрационное досье для государственной регистрации персонализированных пористых титановых имплантатов с биоактивными покрытиями, изготавливаемых с применением аддитивных технологий.

**Ключевые слова:** персонализированные пористые титановые имплантаты, биоактивные покрытия, аддитивные технологии

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

**Финансирование:** работа выполнена в рамках НИОКР, финансируемой ЧУ «Наука и инновации» (ГК «Росатом»).

**Для цитирования:** Каралкин П.А., Кудрин К.Г., Святославов Д.С., Усатов Д.А., Решетов И.В. Разработка и доклинические испытания персонализированных пористых титановых имплантатов с биоактивными покрытиями в модельных системах. *Биомедицина*. 2023;19(3E):104–109. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-104-109>

Поступила 17.04.2023

Принята после доработки 25.04.2023

Опубликована 06.11.2023

## DEVELOPMENT AND PRECLINICAL TRIALS OF CASTOMIZED POROUS TITANIUM IMPLANTS WITH BIOACTIVE COATINGS IN MODEL SYSTEMS

Pavel A. Karalkin<sup>1,\*</sup>, Konstantin G. Kudrin<sup>1,2</sup>, Dmitry S. Svyatoslavov<sup>1</sup>,  
Dmitry A. Usatov<sup>1</sup>, Igor V. Reshetov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia  
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8–2

<sup>2</sup> Academy of Postgraduate Education under Federal Scientific  
and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency of Russia  
125371, Russian Federation, Moscow, Volokolamskoe Highway, 91

This paper presents a technology for creating customized porous titanium implants with bioactive coatings, manufactured using additive technologies. The stages of creating an implant include obtaining primary data from the bone defect area using computed tomography; 3D modeling of the defect area and the corresponding implant; production of a customized implant from titanium alloys using selective laser fusion technology; application of bioactive coatings. The as-created customized implant can have several functional structures. Samples of titanium implants with bioactive coatings were subjected to extensive testing. Mathematical modeling and experiments were used to verify the correspondence of the mechanical properties of the developed structures to natural bone tissue. *In vitro* tests of the studied samples showed the absence of acute toxicity along with high levels of biocompatibility. *In vivo* tests of the studied samples on Soviet chinchilla rabbits and Anubis baboon monkeys approved by local ethical committees showed their adequate biomechanical and high osteoinductive properties. The successful results of preclinical studies, as well as toxicological and technical tests in certified laboratories, made it possible to create a registration dossier for state registration of customized porous titanium implants with bioactive coatings, manufactured using additive technologies.

**Keywords:** personalized porous titanium implants, bioactive coatings, additive technologies.

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

**Funding:** the work was carried out within the framework of R&D funded by the PI “Science and Innovation” (“Rosatom”).

**For citation:** Karalkin P.A., Kudrin K.G., Svyatoslavov D.S., Usatov D.A., Reshetov I.V. Development and Preclinical Trials of Castomized Porous Titanium Implants with Bioactive Coatings in Model Systems. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):104–109. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-104-109>

Submitted 17.04.2023

Revised 25.04.2023

Published 06.11.2023

Увеличение числа случаев онкологических заболеваний, травм, ранений челюстно-лицевой области как в нашей стране, так и за рубежом ведет к увеличению потребности в специализированной помощи при устранении протяженных дефектов костей лицевого скелета [2].

Несмотря на определенные достижения в разработке и применении синтетических полимерных или кальцийфосфатных остеопластических материалов, использование

имплантатов на основе металлов и их сплавов на сегодня остается безальтернативным вариантом для замещения дефектов костной ткани в нагружаемых областях, таких как: кости лицевого части черепа и нижняя челюсть, позвоночник, крупные суставы [1]. При этом среди металлических имплантатов изделия из титана являются наиболее перспективными, поскольку обладают рядом преимуществ: низкая токсичность, отсутствие выраженных аллергических и кан-

церегенных свойств, хорошие показатели механической прочности и пластичности, а также высокое сопротивление усталостным явлениям [6]. В то же время традиционные методы производства титановых имплантатов (литье, прессование и прокатка) не позволяют создавать в полной мере пористые изделия, обладающие одновременно высокими прочностными/усталостными свойствами и низким модулем упругости, близким к значениям натуральной кости; также эти методы по ряду причин не подходят для создания персонализированных изделий. Решение указанных проблем возможно благодаря применению аддитивных технологий, позволяющих получать изделия с необходимыми прочностными характеристиками с учётом анатомических особенностей, которые, помимо прочего, способны содержать как пористые, так и сплошные конструктивные элементы для наиболее полной реконструкции протяженных дефектов костей лицевого скелета [4, 7].

С точки зрения усиления регенеративных свойств титановых имплантатов весьма перспективным подходом является разработка биоактивных покрытий для их поверхностей, содержащих набор биогенных компонентов, где каждая из структурных составляющих выполняет определенную функцию, в частности обеспечивает механическую прочность, износостойкость, коррозионную стойкость, биоактивность и бактерицидность [3, 5].

Описанный выше подход был реализован при разработке технологии создания персонализированных пористых титановых имплантатов с биоактивными покрытиями, изготавливаемых с применением аддитивных технологий. Процесс создания персонализированного имплантата включает несколько этапов.

На первом этапе по данным компьютерной томографии происходит получение 3D-модели костных структур, содержащих дефект. Затем происходит реконструкция

области костного дефекта (при необходимости область дефекта корректируется в соответствии с планируемой резекцией костных тканей).

На втором этапе на основе 3D-моделей костных структур и области дефекта создают 3D-модель имплантата. В зависимости от особенностей области дефекта имплантат может содержать: сетчатые структуры в области контакта с костными тканями для биоинтеграции; ячеистые структуры, обеспечивающие необходимые механические и прочностные свойства несущей части изделия; сплошные структуры для реконструкции тонкостенных областей и других участков, требующих гладких поверхностей. При реконструкции дефектов нижней челюсти с суставным сегментом имплантат будет содержать в области суставной головки полую гладкую сферическую поверхность. При сложной конфигурации дефекта костных тканей выполняется проверка соответствия формы будущего имплантата граничащим сохранным анатомическим структурам путём изготовления стереолитографических моделей с последующим их совмещением и коррекцией (при необходимости) 3D-модели имплантата, что также облегчает планирование последующей хирургической операции.

В ходе моделирования и технических испытаний в сертифицированной государственной лаборатории установлена биоадекватность механических и прочностных свойств ячеистых структур замещаемым костным тканям. Ячеистые структуры подбирались из типоразмерного ряда в соответствии с ожидаемыми механическими свойствами замещаемых костных тканей. Внедрение ячеистых структур в 3D-модель имплантата выполнялось после моделирования формы имплантата и моделирования крепёжных элементов (пластинообразные структуры с отверстиями под стандартные крепёжные винты). На заключительной фазе создания 3D-модели имплантата

та в местах контакта с костными тканями в границах дефекта размещали сетчатые структуры для управления процессами остеоинтеграции.

На третьем этапе в соответствии с 3D-моделью имплантата происходит изготовление персонализированного имплантата по технологии селективного лазерного сплавления. Образцы-свидетели, изготавливаемые совместно с каждой партией имплантатов, позволяют проводить контроль качества.

На четвёртом этапе выполняется нанесение биоактивных покрытий методом магнетронного распыления. В ходе исследований установлено, что оптимальными с точки зрения комбинации твердости, износостойкости и биоактивных свойств являются покрытия на основе TiCN, модифицированные Ca, P и O (TiCaPCON). Наличие доказанных биоактивных свойств, высокой износостойкости и возможности осаждения на поверхность с развитым рельефом делает покрытия состава TiCaPCON перспективным материалом для модификации высокопористых остеоиндуктивных имплантатов, обладающих мультимодальным распределением пор и изготовленных методом селективного лазерного сплавления. При этом дополнительные бактерицидные свойства имплантатов возможно получить благодаря имплантации ионов серебра (Ag) в структуру поверхностного напыления.

Предварительно перед доклиническими исследованиями были проведены токсикологические исследования *in vitro* специфической активности титановых образцов, созданных по описанной выше технологии.

Весь комплекс биологических исследований *in vitro* был выполнен на 3D-образцах без покрытий, а также образцах с многокомпонентным покрытием состава CaPCON или многокомпонентным покрытием состава CaPCON с ионной имплантацией Ag. В экспериментах были использованы два вида клеток: культура остеосаркомы чело-

века линии MG-63 (тест-культура) и культура мультипотентных стромальных клеток костного мозга (МСК КМ) здоровых доноров. На первом этапе методом непрямого контакта показано отсутствие острой токсичности в отношении тест-культуры как образцов исходного высокопористого титана, так и образцов с многокомпонентными биоактивными покрытиями.

Далее были изучены и сравнены процессы адгезии клеток MG-63 к поверхности опытных образцов без покрытия и с двумя типами биоактивных покрытий через 4 и 24 ч культивирования. На основании результатов конфокальной микроскопии и иммуноцитохимии с использованием МАТ к винкулину (белок фокальных контактов) и использования окраски фаллоидином установлены более выраженные адгезивные свойства покрытия состава CaPCON на пористом титане: площадь клеток и количество фокальных контактов с данной поверхностью через 24 ч культивирования в этой группе были максимальными по сравнению с образцами титана без покрытия и с покрытием состава CaPCON с ионной имплантацией Ag.

Результаты, полученные с помощью МТТ-теста и метода Live/Dead, свидетельствуют о том, что разработанные составы многокомпонентных покрытий на пористом имплантате из титана не снижают жизнеспособности и не подавляют пролиферативных потенциалов тест-культуры — клеток остеосаркомы человека линии MG-63. Скорость экспансии клетками поверхности этих разработанных образцов не отличалась от контроля (полистирен). Таким образом, все три типа образцов на основе сплава титана оказались цитосовместимыми и поддерживали адгезию, активную пролиферацию клеток тест-культуры MG-63 и в итоге способствовали эффективной колонизации поверхностей данных образцов.

В исследовании по оценке способности образцов поддерживать остеогенную диф-

ференцировку МСК КМ при условии их культивирования в специальных индукционных средах методом ПРЦ РВ показано, что все три типа образцов в экспериментах *in vitro* в разной степени способствовали остеогенной дифференцировке МСК КМ донора: в этих клетках была определена экспрессия двух из трех изученных маркерных генов — RunX2 и Alpl, что позволяет предполагать остеоинтеграцию образцов при имплантации их в костный дефект *in vivo*.

В целом токсикологические исследования показали безопасность титановых имплантатов, созданных по описанной выше технологии. Полученные результаты проведенных испытаний *in vitro* показали отсутствие острой токсичности при высоких показателях биосовместимости исследованных образцов. По совокупности выявленных биологических эффектов наиболее перспективными для проведения дальнейших доклинических испытаний представляются титановые имплантаты с био-активным покрытием состава CaPCON, дополненные ионами серебра.

Были проведены всесторонние доклинические исследования образцов титановых имплантатов, созданных в соответствии с описанным выше подходом. Предварительно были разработаны модельные костные дефекты для средних и крупных лабораторных животных. Доклинические исследования получили одобрение локального этического комитета.

Исследования биомеханических и остеоиндуктивных свойств имплантатов в моделях костных дефектов проведены на кроликах породы Советская шиншилла. Были сформированы разработанные модель-

ные костные дефекты и выполнено имплантирование изготовленных изделий. Отмечались хорошая переносимость оперативных вмешательств по установке имплантатов, а также начальные признаки репаративного остеогенеза. В результате рентгенографических исследований зоны имплантации выявлена удовлетворительная остеоиндукция.

Также проведены исследования биомеханических и остеоиндуктивных свойств имплантатов в моделях костных дефектов у крупных лабораторных животных. Исследования проведены на обезьянах вида павиан анубис путём имплантации индивидуальных изделий. В результате рентгенографических исследований зоны имплантации установлена удовлетворительная остеоиндукция. Костную регенерацию оценивали по набору количественных параметров: размер костной мозоли в проксимальном отделе, наличие очагов резорбции и литических изменений в проксимальном отделе, затемнение пористых структур в проксимальном отделе.

Удовлетворительные результаты моделирования, исследований *in vitro*, доклинических испытаний *in vivo* на кроликах породы Советская шиншилла и обезьянах вида павиан анубис позволили сформировать регистрационное досье персонализированных пористых титановых имплантатов с био-активными покрытиями, изготавливаемых с применением аддитивных технологий. В ходе подготовки регистрационного досье также успешно пройдены необходимые технические и токсикологические испытания в сертифицированных лабораториях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

---

1. Davis R., Singh A., Jackson M.J., Coelho R.T., Prakash D., Charalambous C.P., Ahmed W., da Silva L.R.R., Lawrence A.A. A comprehensive review on metallic implant biomaterials and their subtractive manufacturing. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 2022;120:1473–1530. DOI: 10.1007/s00170-022-08770-8.
2. Juncar M., Tent P.A., Juncar R.I., Harangus A., Mircea R. An epidemiological analysis of maxillofacial fractures: a 10-year cross-sectional cohort retrospective study of 1007 patients. *BMC Oral Health.* 2021;21(1):128. DOI: 10.1186/s12903-021-01503-5.
3. Narayanan R., Seshadri S.K., Kwon T.Y., Kim K.H. Calcium phosphate-based coatings on titanium and

- its alloys. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2008;85(1):279–299. DOI: 10.1002/jbm.b.30932.
4. Park J., Zobaer T., Sutradhar A.A. Two-Scale Multi-Resolution Topologically Optimized Multi-Material Design of 3D Printed Craniofacial Bone Implants. *Micromachines.* 2021;12:101. DOI: 10.3390/mi120210101.
  5. Xue T., Attarilar S., Liu S., Liu J., Song X., Li L., Zhao B., Tang Y. Surface Modification Techniques of Titanium and its Alloys to Functionally Optimize Their Biomedical Properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8:603072. DOI: 10.3389/fbioe.2020.603072.
  6. Yang J., Liu C., Sun H., Liu Y., Liu Z., Zhang D., Zhao G., Wang Q., Yang D. The progress in titanium alloys used as biomedical implants: From the view of reactive oxygen species. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022;10:1092916. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1092916.
  7. Zumofen L., Kopanska K.S., Bono E., Kirchheim A., De Haller E.B., Graf-Hausner U. Properties of Additive-Manufactured Open Porous Titanium Structures for Patient-Specific Load-Bearing Implants. *Front. Mech. Eng.* 2022;7:830126. DOI: 10.3389/fmech.2021.830126.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Каралкин Павел Анатольевич\***, к.м.н., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
**e-mail:** [karalkin\\_p\\_o@staff.sechenov.ru](mailto:karalkin_p_o@staff.sechenov.ru)

**Pavel A. Karalkin\***, Cand. Sci. (Med.), Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
**e-mail:** [karalkin\\_p\\_o@staff.sechenov.ru](mailto:karalkin_p_o@staff.sechenov.ru)

**Кудрин Константин Геннадьевич**, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр ФМБА России»;  
**e-mail:** [kudrin\\_k@rambler.ru](mailto:kudrin_k@rambler.ru)

**Konstantin G. Kudrin**, Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; Academy of Postgraduate Education under Federal Scientific and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [kudrin\\_k@rambler.ru](mailto:kudrin_k@rambler.ru)

**Святославов Дмитрий Сергеевич**, к.м.н., доц., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
**e-mail:** [dssvyatoslavov78@mail.ru](mailto:dssvyatoslavov78@mail.ru)

**Dmitry S. Svyatoslavov**, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
**e-mail:** [dssvyatoslavov78@mail.ru](mailto:dssvyatoslavov78@mail.ru)

**Усатов Дмитрий Андреевич**, к.м.н., доц., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
**e-mail:** [raincod@gmail.com](mailto:raincod@gmail.com)

**Dmitry A. Usatov**, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
**e-mail:** [raincod@gmail.com](mailto:raincod@gmail.com)

**Решетов Игорь Владимирович**, д.м.н., проф., академик РАН, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр ФМБА России»;  
**e-mail:** [reshetoviv@mail.ru](mailto:reshetoviv@mail.ru)

**Igor V. Reshetov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS, Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; Academy of Postgraduate Education under Federal Scientific and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [reshetoviv@mail.ru](mailto:reshetoviv@mail.ru)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



## ОСОБЕННОСТИ ФАРМАКОКИНЕТИКИ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ДИМЕТИЛАМИНОЭТАНОЛА ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ПУТИ ВВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ

А.Е. Ким<sup>1</sup>, Е.Б. Шустов<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны России  
194044, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

<sup>2</sup> ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»  
192019, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

Новое производное диметиламиноэтанола, бутандиовой и транс-бутендиовой кислот (лабораторный шифр АДК-17) синтезировано на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (заведующий кафедрой проф. И.П. Яковлев) и представляет собой перспективное ноотропное и противоастеническое средство, планируемое к применению в виде пероральной лекарственной формы. Цель работы — получение расчетных фармакокинетических показателей и определение возможных для соединения путей биотрансформации. В качестве тест-системы для доклинического изучения фармакокинетики соединения были использованы кролики породы Советская шиншилла, у которых в соответствии с графиком осуществлялся забор крови из краевой вены уха и взятие проб мочи. Количественное определение в биосредах проводили с использованием жидкостного хроматографа Ultimate 3000 с масс-селективным детектором Q-Exactive с электрораспылительной ионизацией в соответствии с ОФС 1.2.1.100015 (Хроматография) Государственной Фармакопеи методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (УЭЖХ-МС). Для проведения исследований фармакокинетики препарата АДК-17 была разработана методика измерений с пределом обнаружения в биосредах в диапазоне от  $10^{-6}$  до  $10^{-3}$  мг/мл. Фармакокинетические параметры показывают, что всасывание АДК-17 в системный кровоток из желудочно-кишечного тракта происходит со средней скоростью, максимум концентрации в плазме крови при пероральном пути введения наблюдался между 60–90 мин. Период полувыведения из системного кровотока составляет 4,3 ч. Экскреция с мочой в первые 4 ч идёт с большой скоростью, но соединение детектируется в моче в течение 3-х сут и в крови в течение 2-х сут с момента введения.

**Ключевые слова:** фармакокинетика, фармакокинетическое моделирование, ультраэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, диметиламиноэтанол

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

**Для цитирования:** Ким А.Е., Шустов Е.Б. Особенности фармакокинетики нового производного диметиламиноэтанола при пероральном пути введения лабораторным животным. *Биомедицина*. 2023;19(3E):110–113. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-110-113>

Поступила 17.04.2023

Принята после доработки 17.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## PHARMACOKINETICS OF A NEW DIMETHYLAMINEETHANOL DERIVATIVE ADMINISTERED ORALLY TO LABORATORY ANIMALS

Aleksey E. Kim<sup>1</sup>, Evgeny B. Shustov<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia  
194044, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika Lebedeva Str., 6

<sup>2</sup> Scientific and Clinical Center of Toxicology named after S.N. Golikov  
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia  
192019, Russian Federation, St. Petersburg, Bekhtereva Str., 1

A new derivative of dimethylaminoethanol, butanedioic and trans-butenedioic acids (laboratory code ADK-17) was synthesized at the Organic Chemistry Department of the Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (SPSPU). This promising nootropic and anti-asthmatic agent is planned for use in an oral dosage form. The aim was to calculate the pharmacokinetic parameters of the synthesized compound and to determine its possible biotransformation pathways. Rabbits of the Soviet Chinchilla breed were used as a test system in the preclinical study of the compound pharmacokinetics. In accordance with the designed schedule, blood was taken from the marginal vein of the ear, and urine samples were taken. Quantitative determination in biological media was carried out using an Ultimate 3000 liquid chromatograph with a Q-Exactive mass-selective detector with electrospray ionization in accordance with OFS 1.2.1.100015 (Chromatography) of the State Pharmacopoeia by ultra-performance liquid chromatography–mass spectrometry (UPLC-MS). To study the pharmacokinetics of the ADK-17 preparation, a measurement procedure was developed with a detection limit in biological media ranging from  $10^{-6}$  to  $10^{-3}$  mg/ml. The determined pharmacokinetic parameters show that the absorption of ADK-17 into the systemic circulation from the gastrointestinal tract occurs at an average rate, with its maximum concentration in blood plasma during the oral route of administration being observed between 60–90 min. The elimination half-life from the systemic circulation comprises 4.3 h. Urinary excretion in the first 4 h proceeds at a high rate; however, the compound is detected in the urine within 3 days and in the blood within 2 days from the moment of administration.

**Keywords:** pharmacokinetics, pharmacokinetic modeling, ultra performance liquid chromatography with mass spectrometric detection, dimethylaminoethanol

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

**For citation:** Kim A.E., Shustov E.B. Pharmacokinetics of a New Dimethylaminoethanol Derivative Administered Orally to Laboratory Animals. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):110–113. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-110-113>

Submitted 17.04.2023

Revised 17.05.2023

Published 06.11.2023

### Введение

Изучение фармакокинетики является обязательным этапом доклинического изучения перспективных для внедрения новых биологически активных веществ [7, 8]. Фармакокинетика является одной из основополагающих, базовых дисциплин в экспериментальной и клинической фармакологии, изучающей перемещение

и трансформацию лекарства в организме человека. Наглядным примером значимости этих процессов является фармакокинетическое моделирование [1-4].

Новое производное диметиламиноэтанола, бутандиовой и транс-бутендиовой кислот (лабораторный шифр АДК-17) синтезировано на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного



химико-фармацевтического университета (зав. каф. проф. И.П. Яковлев) и представляет собой перспективное ноотропное и противоастеническое средство, планируемое к применению в виде пероральной лекарственной формы. Для данного соединения ранее фармакокинетические показатели не определялись, в связи с чем **целью работы** было получение расчетных фармакокинетических показателей и определение возможных для соединения путей биотрансформации.

### Материалы и методы

Для проведения исследований фармакокинетики препарата АДК-17 была разработана и валидирована методика измерений с пределом обнаружения в биосредах в диапазоне от  $10^{-6}$  до  $10^{-3}$  мг/мл. Количественное определение проводили с использованием жидкостного хроматографа Ultimate 3000 с масс-селективным детектором Q-Exactive с электрораспылительной ионизацией в соответствии с ОФС 1.2.1.100015 (Хроматография) методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (УЭЖХ-МС). Аналитические характеристики для определения целевого соединения следующие: время удерживания 5,5 мин, массовое число регистрируемого дочернего иона ( $m/z$ ) 145,04960.

В качестве тест-системы были использованы кролики породы Советская шиншилла массой тела 2,7–3,3 кг. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».

Тестируемую субстанцию вводили однократно в зависимости от выбора пути введения в ушную вену или перорально с помощью зонда в дозе 10 мг/кг. В качестве биологического материала для оценки фар-

макокинетических параметров использовали плазму крови. Отбор образцов крови производился перед началом эксперимента и через 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 24,0 и 48,0 ч после введения исследуемой субстанции. Взятие проб мочи осуществлялось через 4, 24, 48, 72 и 96 ч. Анализ результатов проводили с использованием пакетов Statistica 13.0 и пакета SimBiology в составе программного комплекса Matlab-2021b.

Сравнительная оценка качества моделей свидетельствовала о сопоставимости двух- и трехкамерных моделей с более высоким качеством для двухкомпарментного способа аппроксимации данных [3].

Поиск метаболитов любого экзогенного соединения выполнялся в два этапа: теоретические исследования с использованием пакетов прикладных программ по возможным путям биотрансформации целевых компонентов и экспериментальные исследования при введении лабораторным животным анализируемых веществ [5]. Для теоретического моделирования возможных метаболических реакций с участием широкого круга семейств ферментов использовали программу Metabolizer ChemAxon Ver 14.12.15.

### Результаты исследований

Установлено, что при метаболической трансформации препарат АДК-17 может образовывать четыре возможных основных метаболита: 1 — продукт гидролиза по эфирной связи, 2 — продукт деметилирования, 3 — продукт гидроксирования, 4 — продукт гидроксирования и окисления.

При анализе фактических масс-хроматограмм обращает на себя внимание присутствие как катионной (непротонированной или протонированной) и анионной части препарата АДК-17, так и низкоамплитудных пиков предсказанных метаболитов. Катионная часть молекулы присутствует в плазме крови и моче практически в неиз-

менном виде. Метаболит, представляющий продукт гидролиза эфирной части, определяется в плазме крови на грани чувствительности методик.

## Заключение

На основании полученных данных были вычислены основные фармакокинетические параметры соединения АДК-17 при пероральном пути введения. Всасывание действующего вещества в системный кровоток из желудочно-кишечного тракта происходит со средней скоростью, максимум концентрации в плазме крови кроликов

наблюдался между 60–90 мин. Объем распределения составил 50 л/кг, что свидетельствует об эффективном перераспределении соединения из кровяного русла в ткани. Период полувыведения из системного кровотока составляет 4,3 ч. Клиренс соединения 0,23 мл/мин. Экскреция АДК-17 с мочой в первые 4 ч идет с большой скоростью, препарат в это время в основном элиминирует с мочой в неизменном виде. Следовое количество препарата определяется в крови в течение 2-х сут с момента введения, в моче — в течение 3-х сут.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. *Фармакокинетика*. Р.-н.-Д.: Феникс, 2001:384. [Karkischenko N.N., Khoron'ko V.V., Sergeeva S.A., Karkischenko V.N. *Pharmacokinetics*. Rostov-on-Don: Feniks Publ., 2001:384. (In Russian)].
2. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. *Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение*. М.: Издательство РАМН, 2003:208. [Sergienko V.I., Dzhelliff R., Bondareva I.B. *Prikladnaya farmakokinetika: osnovnyye polozheniya i klinicheskoe primeneniye* [Applied Pharmacokinetics: Fundamentals and Clinical Applications]. Moscow: Izdatel'stvo RAMN, 2003:208. (In Russian)].
3. Холодов Л.Е., Яковлев В.П. *Клиническая фармакокинетика*. М.: Медицина, 1985:464. [Kholodov L.E., Yakovlev V.P. *Clinical pharmacokinetics*. Moscow: Meditsina Publ., 1985:464. (In Russian)].
4. Bayer A.S., Crowell D., Nast C.C., Norman D.C., Borrelli R.L. Intravegetation antimicrobial distribution in aortic endocarditis analyzed by computer-generated model. Implications for treatment. *Chest*. 1990;97(3):611–617. DOI: 10.1378/chest.97.3.611.
5. O'Connor D., Mortishire-Smith R. High-throughput bioanalysis with simultaneous acquisition of metabolic route data using ultra performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006;385(1):114–121. DOI: 10.1007/s00216-006-0353-1.
6. Smith D.A., Allerton C., Kalgutkar A.S., van de Waterbeemd H., Walker D.K. *Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012:257. DOI: 10.1002/9783527645763.
7. Zaragoza D.F. *Lead Optimization for Medicinal Chemists*. Baltimore: Wiley, 2012:622. DOI: 10.1002/9783527645640.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Ким Алексей Евгеньевич**, к.м.н., доц., ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России;  
e-mail: [alexpann@mail.ru](mailto:alexpann@mail.ru)

**Aleksey E. Kim**, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of Russia;  
e-mail: [alexpann@mail.ru](mailto:alexpann@mail.ru)

**Шустов Евгений Борисович\***, д.м.н., проф., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» ФМБА России;  
e-mail: [shustov-msk@mail.ru](mailto:shustov-msk@mail.ru)

**Evgeny B. Shustov\***, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific and Clinical Center of Toxicology named after S.N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [shustov-msk@mail.ru](mailto:shustov-msk@mail.ru)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



## ВЛИЯНИЕ L-ТИРОКСИНА, ПРИРОДНОГО ЛИГАНДА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА, НА КИНЕТИКУ ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЯ β-АМИЛОИДНОГО ПЕПТИДА

Е.А. Литус\*, Е.Л. Немашкалова, А.А. Вологжанникова, Е.И. Дерюшева

*Институт биологического приборостроения  
ФГБУН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований» РАН  
142290, Российская Федерация, Московская обл., Пушкино, просп. Науки, 3*

Лиганды человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) обладают способностью модулировать его взаимодействие с β-амилоидным пептидом (Аβ), который является ключевым фактором патогенеза болезни Альцгеймера (БА). L-тироксин (L-Tr) — природный лиганд ЧСА, который, по данным эпидемиологических исследований и исследований на животных моделях, связан с патогенезом БА. В данной работе была изучена кинетика фибриллообразования Аβ в присутствии L-Tr и ЧСА с помощью флуоресцентного теста с тиафлавином Т. L-Tr не оказывал достоверного влияния на ингибирующий эффект ЧСА по отношению к процессу роста фибрилл. В то же время L-Tr сам по себе обладал ингибирующим эффектом, сравнимым с эффектом ЧСА. Полученные нами данные частично могут объяснить связь БА с патологиями щитовидной железы.

**Ключевые слова:** L-тироксин, человеческий сывороточный альбумин, β-амилоидный пептид, болезнь Альцгеймера

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

**Финансирование:** исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20-74-10072.

**Для цитирования:** Литус Е.А., Немашкалова Е.Л., Вологжанникова А.А., Дерюшева Е.И. Влияние L-тироксина, природного лиганда человеческого сывороточного альбумина, на кинетику фибриллообразования β-амилоидного пептида. *Биомедицина*. 2023;19(3E):114–118. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-114-118>

Поступила 20.04.2023

Принята после доработки 15.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## EFFECT OF L-THYROXINE, A HUMAN SERUM ALBUMIN NATURAL LIGAND, ON THE KINETICS OF β-AMYLOID PEPTIDE FIBRIL FORMATION

Ekaterina A. Litus\*, Ekaterina L. Nemashkalova, Alisa A. Vologzhannikova,  
Evgeniya I. Deryusheva

*1Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research  
of the Russian Academy of Sciences  
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 3*

Ligands of human serum albumin (HSA) are capable of modulating its interaction with β-amyloid peptide (Aβ), which is a key factor in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). L-thyroxine (L-Tr), a natural HSA ligand, is associated with the pathogenesis of AD according to epidemiological and animal model

studies. In this work, we studied the kinetics of A $\beta$  fibril formation in the presence of L-Tr and HSA using a fluorescent test with thioflavin T. L-Tr had no significant effect on the inhibitory effect of HSA on fibril growth. At the same time, L-Tr itself had an inhibitory effect similar to that of HSA. Our data can partially explain the relationship between AD and thyroid pathologies.

**Keywords:** L-thyroxine, human serum albumin, amyloid- $\beta$  peptide, Alzheimer's disease

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

**Funding:** the research was funded by a grant from the Russian Science Foundation No. 20-74-10072.

**For citation:** Litus E.A., Nemashkalova E.L., Vologzhannikova A.A., Deryusheva E.I. Effect of L-thyroxine, a Human Serum Albumin Natural Ligand, on the Kinetics of  $\beta$ -amyloid Peptide Fibril Formation. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):114–118. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-114-118>

Submitted 20.04.2023

Revised 15.05.2023

Published 06.11.2023

## Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) — социально значимое заболевание (постановление Правительства РФ № 715 от 01.12.2004), отличительной чертой которого является неуклонно прогрессирующее развитие. Для спорадических форм БА характерны повышение продукции и снижение скорости выведения  $\beta$ -амилоидного пептида (A $\beta$ ). В ряде исследований в качестве перспективной мишени для разработки новых подходов к терапии и профилактике БА рассматривается человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), играющий роль депо A $\beta$  в периферическом кровотоке [5, 11]. Усиление взаимодействия ЧСА с A $\beta$  должно способствовать сдвигу равновесия между периферическим кровотоком и центральной нервной системой в сторону выведения A $\beta$ . С другой стороны, ЧСА взаимодействует с большим количеством экзогенных и эндогенных лигандов, которые могут существенно менять его функциональную активность. Ранее нами был проведен систематический поиск лигандов ЧСА, потенциально способных модулировать его взаимодействие с A $\beta$  [1]. Экспериментально было показано, что увеличения сродства ЧСА с A $\beta$  можно добиться с помощью таких лигандов, как серотонин, ибупрофен, ненасыщенные жирные кислоты [8–10]. Однако эффекты многих

лигандов ЧСА на процесс его взаимодействия с A $\beta$  остаются на данный момент неизученными. L-тироксин (L-Tr) (DrugBank Accession Number: DB00451), являющийся природным лигандом ЧСА, представляет собой эндогенный гормон щитовидной железы. Синтетический L-Tr используется для лечения гипотиреоза, а также тиреотропин-зависимого высокодифференцированного рака щитовидной железы [2]. Кроме того, по данным эпидемиологических исследований [7] и исследований на животных моделях [3], L-Tr связан с патогенезом БА. В данной работе была изучена кинетика фибриллообразования A $\beta$  в присутствии L-Tr и ЧСА с помощью флуоресцентного теста с тиофлавином T, а также проведено моделирование комплекса ЧСА- L-Tr.

## Материалы и методы

В ходе исследований были использованы человеческий сывороточный альбумин (Merck, #126654), тиофлавин T («Sigma-Aldrich»), L-Tr («Thermo Scientific Chemicals»), а также рекомбинантный человеческий A $\beta$  (длиной 40 аминокислотных остатков, A $\beta$ 40), полученный по методике, разработанной в нашей лаборатории [9]. Исследование с тиофлавином T проводили в соответствии с описанием в статье [9]. Конечные концентрации L-Tr и ЧСА составили 15 и 2 мкМ соответственно.

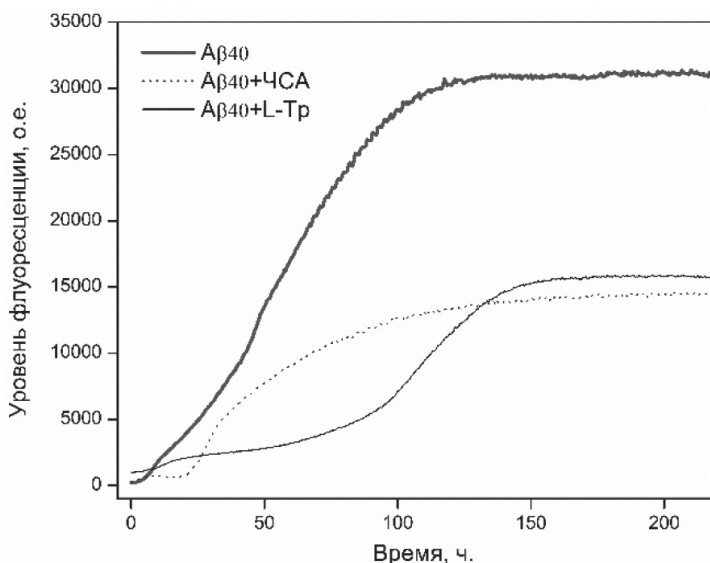
Трехмерная структура ЧСА (PDB ID: 1A06) была получена из Protein Data Bank. Трехмерная структура L-Тр была получена в формате sdf с сервера PubChem и преобразована в файл pdb с помощью PyMOL v.1.6.9.0. Для моделирования комплекса ЧСА-L-Тр использовалась программа AutoDock Vina. Характеристики взаимодействия комплекса были получены помощью специализированного сервиса PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>).

### Результаты и их обсуждение

Оценку влияния L-Тр на функциональную активность ЧСА проводили по изменению ингибирующего эффекта ЧСА на рост фибрилл Аβ40. Кинетику процесса образования фибрилл Аβ40 изучали с помощью флуоресцентного теста с тиофлавином Т (рис.). Уровень максимального сигнала флуоресценции тиофлавина Т, полученный

для образцов фибрилл в присутствии ЧСА, был снижен вдвое по сравнению с образцами фибрилл, полученными в отсутствие каких-либо добавок. Дополнительное присутствие L-Тр значимо не повлияло на эффект ЧСА. В то же время в отсутствие ЧСА L-Тр сам по себе значимо подавлял образование фибрилл Аβ40: максимальный сигнал флуоресценции снижался вдвое.

Сайт связывания L-Тр на молекуле ЧСА по данным смоделированного нами комплекса содержит остатки I (ARG145, ASN109, HIS146, ARG114, ARG186) и III (GLU425, GLN459, LYS525) структурных доменов ЧСА. При этом основной сайт связывания Аβ40 на ЧСА расположен пространственно выше [4], чем выявленный сайт L-Тр. Этим фактом может объясняться отсутствие значимых эффектов присутствия L-Тр на ингибирующее действие ЧСА в отношении процесса фибриллообразования Аβ40.



**Рис.** Изменение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т (длина волны 485 нм), отражающее рост фибрилл Аβ40 без добавок или в присутствии ЧСА/L-Тр.

**Fig.** Change in the intensity of thioflavin T fluorescence (wavelength 485 nm), reflecting the growth of Аβ40 fibrils without additives or in the presence of HSA/L-Tr.

## Выводы

В данной работе нами было показано, что L-Тр ингибирует процесс образования фибрилл А $\beta$ 40. Найденный эффект согласуется и может частично объяснить накопленные эпидемиологические данные об ассоциации БА с гипотиреозом, а также

о снижении уровня L-Тр в цереброспинальной жидкости пациентов с диагнозом БА [6, 7]. Тем не менее результаты исследований, посвященных связи БА с различными патологиями щитовидной железы, противоречивы [12], поэтому необходимы дальнейшие *in vivo* и *in vitro* исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Дерюшева Е.И., Немашкалова Е.Л., Шевелёва М.П., Литус Е.А. Биоинформатический поиск и формирование панели лигандов сывороточного альбумина, модулирующих его взаимодействие с А $\beta$ пептидом. Докл. Межд. конф. «Математическая биология и биоинформатика». Под ред. В.Д. Лакно. Т. 9. Пушчино: ИМБП РАН, 2022. [Deryusheva E.I., Nemashkalova E.L., Shevelyova M.P., Litus E.A. Bioinformaticheskiy poisk i formirovaniye paneli ligandov syvorotochnogo al'bumina, moduliruyushchih ego vzaimodejstviye s A $\beta$ peptidom [Bioinformatic search and formation of a panel of serum albumin ligands that modulate its interaction with A $\beta$ -peptide]. Dokl. Mezhd. konf. "Matematicheskaya biologiya i bioinformatika" [Proceedings of the International Conference "Mathematical Biology and Bioinformatics"]. Ed. by V.D. Lakhno. Vol. 9. Pushchino: IMBP of the RAS Publ., 2022. (In Russian)]. DOI: 10.17537/icmbb22.1.
2. Cheng S.Y., Leonard J.L., Davis P.J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr. Rev.* 2010;31(2):139–170. DOI: 10.1210/er.2009-0007.
3. Fu A.L., Zhou C.Y., Chen X. Thyroid hormone prevents cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2010;58(4–5):722–729. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2009.12.020.
4. Choi T.S., Lee H.J., Han J.Y., Lim M.H., Kim H.I. Molecular insights into human serum albumin as a receptor of amyloid- $\beta$  in the extracellular region. *J. Am. Chem. Soc.* 2017;139(43):15437–15445. DOI: 10.1021/jacs.7b08584.
5. Ishima Y., Mimono A., Tuan Giam Chuang V., Fukuda T., Kusumoto K., Okuhira K., Suwa Y., Watanabe H., Ishida T., Morioka H., Maruyama T., Otagiri M. Albumin domain mutants with enhanced A $\beta$  binding capacity identified by phage display analysis for application in various peripheral A $\beta$  elimination approaches of Alzheimer's disease treatment. *IUBMB Life.* 2020;72(4):641–651. DOI: 10.1002/iub.2203.
6. Johansson P., Almqvist E.G., Johansson J.-O., Mattsson N., Hansson O., Wallin A., Blennow K., Zetterberg H., Svensson J. Reduced cerebrospinal fluid level of thyroxine in patients with Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(7):1058–1066. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2012.10.012.
7. Kim J.H., Lee H.S., Kim Y.H., Kwon M.J., Kim J.H., Min C.Y., Yoo D.M., Choi H.G. The Association Between Thyroid Diseases and Alzheimer's Disease in a National Health Screening Cohort in Korea. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:815063. DOI: 10.3389/fendo.2022.815063.
8. Litus E.A., Kazakov A.S., Deryusheva E.I., Nemashkalova E.L., Shevelyova M.P., Nazipova A.A., Permyakova M.E., Raznikova E.V., Uversky V.N., Permyakov S.E. Serotonin Promotes Serum Albumin Interaction with the Monomeric Amyloid  $\beta$  Peptide. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(11):5896. DOI: 10.3390/ijms22115896.
9. Litus E.A., Kazakov A.S., Deryusheva E.I., Nemashkalova E.L., Shevelyova M.P., Machulin A.V., Nazipova A.A., Permyakova M.E., Uversky V.N., Permyakov S.E. Ibuprofen Favors Binding of Amyloid- $\beta$  Peptide to Its Depot, Serum Albumin. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(11):6168. DOI: 10.3390/ijms23116168.
10. Litus E.A., Kazakov A.S., Sokolov A.S., Nemashkalova E.L., Galushko E.I., Dzhus U.F., Marchenkov V.V., Galzitskaya O.V., Permyakov E.A., Permyakov S.E. The binding of monomeric amyloid  $\beta$  peptide to serum albumin is affected by major plasma unsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019;510(2):248–253. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.01.081.
11. Menendez-Gonzalez M., Gasparovic C. Albumin Exchange in Alzheimer's Disease: Might CSF Be an Alternative Route to Plasma? *Front. Neurol.* 2019;10:1036. DOI: 10.3389/fneur.2019.01036.
12. Quinlan P., Horvath A., Eckerström C., Wallin A., Svensson J. Altered thyroid hormone profile in patients with Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology.* 2020;121:104844. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2020.104844.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Литус Екатерина Андреевна\***, к.м.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

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

**Ekaterina A. Litus\***, Cand. Sci. (Med.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

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

**Немашкалова Екатерина Леонидовна**, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

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

**Ekaterina L. Nemashkalova**, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

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

**Вологжаникова Алиса Андреевна**, к.б.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

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

**Alisa A. Vologzhannikova**, Cand. Sci. (Biol.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

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

**Дерюшева Евгения Игоревна**, к.ф.-м.н., Институт биологического приборостроения ФГБУН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН;

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

**Evgeniya I. Deryusheva**, Cand. Sci. (Phis.-Math.), Institute for Biological Instrumentation of the Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences;

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

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## ВЛИЯНИЕ *L. REUTERI* НА НЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

А.Н. Овчарова\*, Н.В. Белова

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

Для коррекции и профилактики нарушений микрофлоры желудочно-кишечного тракта широко используются микробные препараты — пробиотики, оказывающие положительное воздействие на состав кишечной микрофлоры, иммунную систему животных. Особую роль в становлении нормальной микрофлоры играют лактобациллы. Они обладают выраженной антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также рядом других положительных эффектов. Целью данного исследования было определить влияние новых пробиотических штаммов *L. reuteri* на показатели неспецифической резистентности, гематологические и биохимические показатели лабораторных кроликов. В ходе исследования было установлено, что изучаемые штаммы оказывают выраженное положительное действие на показатели неспецифической резистентности. Так, фагоцитарная активность была достоверно выше в опытной группе на 20% относительно контроля, бактерицидная активность достоверно возросла у опытных кроликов на 31%. Повышалось содержание гемоглобина, эритроцитов и общего белка в сыворотке крови.

**Ключевые слова:** пробиотики, лактобациллы, неспецифическая резистентность, гематологические показатели, биохимические показатели

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

**Для цитирования:** Овчарова А.Н., Белова Н.В. Влияние *L. reuteri* на неспецифическую резистентность и гематологические показатели лабораторных животных. *Биомедицина*. 2023;19(3E):119–123. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-119-123>

Поступила 03.04.2023

Принята после доработки 11.04.2023

Опубликована 06.11.2023

## THE EFFECT OF *L. REUTERI* ON NONSPECIFIC RESISTANCE AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF LABORATORY ANIMALS

Anastasia N. Ovcharova\*, Nadezhda V. Belova

*The All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals —  
Branch of the Federal Science Center for Animal Husbandry —  
the All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst  
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institute Village*

Probiotics are microbial preparations, which have a positive effect on the composition of the intestinal microflora and the immune system of animals. These preparations are widely used for correcting and preventing violations of the microflora of the gastrointestinal tract. Lactobacilli play a special role in the formation of normal microflora. They exhibit a pronounced antagonistic activity against pathogenic and opportunistic



microorganisms, as well as possess a number of other positive effects. This study is aimed at determining the effect of new probiotic strains of *L. reuteri* on the indicators of nonspecific resistance, hematological and biochemical parameters of laboratory rabbits. The studied strains were found to have a pronounced positive effect on the indicators of nonspecific resistance. Thus, compared to the control, the indicators of phagocytic activity and bactericidal activity in the experimental group were by 22% and 32% higher, respectively. The content of hemoglobin, erythrocytes and total protein in the blood serum also increased.

**Keywords:** probiotics, lactobacilli, nonspecific resistance, hematological parameters, biochemical parameters

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

**For citation:** Ovcharova A.N., Belova N.V. The effect of *L. reuteri* on Nonspecific Resistance and Hematological Parameters of Laboratory Animals. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):119–123. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-119-123>

Submitted 03.04.2023

Revised 11.04.2023

Published 06.11.2023

## Введение

С внедрением в лечебную практику антибиотиков широкого спектра действия резко возросло число инфекций, вызванных оппортунистическими микроорганизмами эндогенного происхождения. Антибактериальные препараты негативно влияют на микробную экологию организма хозяина, воздействуя не только на возбудителя в месте локализации инфекции, но и на нормальную микрофлору кишечника [8]. Использование пробиотиков является одним из самых эффективных и физиологически оправданных путей профилактики и коррекции нарушения микробиоценоза желудочно-кишечного тракта, а также развивающихся вследствие этого ряда вторичных расстройств не только пищеварительной, но и иммунной и эндокринной систем [2]. Пробиотики начинают оказывать влияние на состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта уже в первые часы после введения. В течение двух недель после начала применения пробиотических препаратов отмечается подавление условно-патогенных микроорганизмов, в частности энтеробактерий, повышается содержание представителей нормальных *E. coli*, энтерококков бифидобактерий и лактобацилл. Отмечаются изменения цитокино-

вого профиля и морфологические изменения в органах пищеварительной и иммунной систем организма экспериментальных животных [3].

Большую роль в нормализации нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта играют лактобациллы. Они обладают выраженной антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также в отношении других видов и даже родственных штаммов лактобацилл благодаря выработке ими молочной кислоты и других органических кислот, которые понижают pH содержимого тонкого кишечника, тем самым создавая оптимальные условия для функционирования остальных представителей симбионтной микрофлоры. Помимо этого, продуктами метаболизма лактобактерий также являются антибиотикоподобные субстанции, обладающие антимикробным действием по отношению как к близкородственным бактериям, так и к представителям условно-патогенной и патогенной микрофлоры [1, 4, 9]. Молочнокислые бактерии также продуцируют перекись водорода, снижают окислительно-восстановительный потенциал среды, участвуют в конкуренции за сайты адгезии и питательные вещества

[6]. Иммуномодулирующий эффект лактобацилл осуществляется посредством влияния на созревание и функционирование иммунокомпетентных органов, увеличение фагоцитарной активности макрофагов и нейтрофилов, стимуляции синтеза интерферонов и цитокинов [7].

Среди биологически активных веществ, секретируемых лактобактериями, большую роль играют ферменты. Так, например, гидролазы, обеспечивают клетки низкомолекулярными продуктами распада компонентов питания, которые являются основными или дополнительными факторами роста, необходимыми для полноценного развития популяций молочнокислых бактерий и, кроме того, могут быть использованы организмом-хозяином [5].

## Материалы и методы

Исследование было проведено на кроликах калифорнийской породы. Из 3-месячных животных были сформированы случайным образом две группы по 10 голов в каждой, используя в качестве критерия массу тела, так чтобы индивидуальная масса животных не отличалась более чем на 10% от средней массы животных. Опытная группа в дополнение к основному рациону (ОР) получала смесь двух штаммов *L. reuteri*. Препарат в количестве 1 мл на голову, содержащий  $1 \times 10^{10}$  КОЕ, выпаивали индивидуально каждому кролику ежедневно в течение месяца. Штаммы *L. reuteri* 395 и 238 были выделены из содержимого кишечника здорового теленка в лаборатории биотехнологии микроорганизмов. По результатам токсикологических исследований штаммы безопасны для теплокровных животных, устойчивы к желчи и соляной кислоте, проявляют антагонизм к бактериям рода *Salmonella*, *Klebsiella*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. faecalis*, устойчивы к антибиотикам группы пенициллинов,

аминогликозидов, нитрофуранов, фторхинолонов, проявляют высокую адгезивную способность к энтероцитам, депонированы в ВКМ.

Продолжительность опыта составила 1 мес., в течение которого ежедневно осуществляли контроль за общим состоянием животных, в начале и конце опыта проводили отбор крови из краевой ушной вены.

## Результаты исследований

Гематологические показатели кроликов по окончании исследования находились в пределах физиологической нормы. Количество эритроцитов и гемоглобина в крови животных опытной группы было выше, чем в группе контроля.

Было выявлено изменение показателей неспецифической резистентности. Достоверно возростала фагоцитарная активность — 67,2% в опытной группе и 47,1% в контроле ( $p < 0,01$ ). Бактерицидная активность также достоверно возростала у кроликов опытной группы — 66,1% в опыте и 35,4% в контроле ( $p < 0,01$ ). Однако содержание лизоцима в сыворотке крови у животных как контрольной, так и опытной групп практически не менялось. Биохимические показатели сыворотки крови находились в пределах физиологической нормы, однако отмечалось более высокое содержание альбумина (42,05 г/л в опыте и 36,01 г/л в контроле) и общего белка (66,9 г/л в опыте и 60,2 г/л в контроле), что говорит об интенсификации метаболических процессов в организме животных.

## Заключение

Таким образом, применение пробиотического препарата *L. reuteri* оказывает значительное влияние на показатели неспецифической резистентности, некоторые гематологические и биохимические показатели крови лабораторных животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл. *Бюллетень сибирской медицины*. 2003;2(4):50–58. [Glushanova N.A. Biologicheskie svoystva laktobacill [Biological properties of lactobacillus]. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2003;2(4):50–58. (In Russian)].
2. Данилевская Н.В. Фармакологические аспекты применения пробиотиков в ветеринарии. *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. 2012;10:8–14. [Danilevskaya N.V. Farmakologicheskie aspekty primeneniya probiotikov v veterinarii [Pharmacological aspects of the use of probiotics in veterinary medicine]. *Veterinariya sel'skhozvaystvennykh zhivotnyh [Farm animal veterinary]*. 2012;10:8–14. (In Russian)].
3. Козловский Ю.Е., Хомякова Т.И., Козловская Г.В., Магомедова А.Д., Пустовалов С.А., Чертович Н.Ф. Некоторые аспекты взаимодействия пробиотических бактерий с организмом экспериментальных животных. *Кролиководство и звероводство*. 2018;1:28–32. [Kozlovsky Yu.E., Khomyakova T.I., Kozlovskaya G.V., Magomedova A.D., Pustovalov S.A., Chertovich N.F. Nekotorye aspekty vzaimodejstviya probioticheskikh bakterij s organizmom eksperimental'nyh zhivotnyh [Some aspects of the interaction of probiotic bacteria with the body of experimental animals]. *Krolikovodstvo i zverovodstvo [Rabbit breeding and fur farming international interdisciplinary journal]*. 2018;1:28–32. (In Russian)].
4. Новик Г.И., Мелентьев Г.И., Самарцев А.А. Биологическая активность микроорганизмов — пробиотиков. *Микробиология*. 2006;2:187–194. [Novik G.I., Melentyev G.I., Samartsev A.A. Biologicheskaya aktivnost' mikroorganizmov — probiotikov [Biological activity of probiotic microorganisms]. *Microbiology*. 2006;2:187–194. (In Russian)].
5. Рябая Н.Е., Самарцев А.А. Ферментативная активность бифидо- и лактобактерий, входящих в состав пробиотиков. Мат-лы Межд. науч.-практ. конф. 25–28 мая 2005 г., Минск-Нарочь. Сост. и общ. ред. А.Н. Евтушенкова. Мн.: РИВШ, 2005:218–219. [Ryabaya N.E., Samarcev A.A. *Fermentativnaya aktivnost' bifido- i laktobakterij, vkhodyashchih v sostav probiotikov [Enzymatic activity of bifidobacteria and lactobacilli included in probiotics]*. Mat-ly Mezhd. nauch.-prakt. konf. 25–28 maya 2005 g., Minsk-Naroch' [Materials of the International Scientific and Practical Conference May 25–28, 2005, Minsk-Naroch]. Comp. and the gen. ed. of A.N. Yevtushenkov. Minsk:RIVSh Publ. 2005:218–219. (In Russian)].
6. Светлакова Е.В., Ожередова Н.А., Веревкина М.Н., Кононов А.Н. Использование молочнокислых бактерий в биотехнологических процессах. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;3:559. [Svetlakova E.V., Ozheredova N.A., Verevkina M.N., Kononov A.N. Ispol'zovanie molochnokislykh bakterij v biotekhnologicheskikh processah [Using lactic acid bacteria in biotechnological processes]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya [Modern Problems of Science and Education]*. 2015;3:559. (In Russian)].
7. Тераевич А.С., Закрепина Е.Н. Влияние пробиотиков на клеточный и гуморальный иммунитет. *Электронный научный журнал*. 2016;7(10):23–27. [Teraevich A.S., Zakrepina E.N. Vliyanie probiotikov na kletochnyj i gumoral'nyj immunitet [The effect of probiotics on cellular and humoral immunity]. *Elektronnyj nauchnyj zhurnal [Electronic scientific journal]*. 2016;7(10):23–27. (In Russian)].
8. Шендеров Б.А. Антимикробные препараты и нормальная микрофлора: проблемы и возможные пути их решения. *Антибиотики и химиотерапия*. 1988;339(12):921–926. [Shenderov B.A. Antimi-krobnnye preparaty i normal'naya mikroflora: problemy i vozmozhnye puti ih resheniya [Antimicrobials and normal microflora: problems and possible solutions]. *Antibiotics and chemotherapy*. 1988;339(12):921–926. (In Russian)].
9. Ljungh A., Wadström T. Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2006;7(2):73–89.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Овчарова Анастасия Никитовна\***, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;  
**e-mail:** [a.n.ovcharova@mail.ru](mailto:a.n.ovcharova@mail.ru)

**Anastasia N. Ovcharova\***, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals — Branch of the Federal Science Center for Animal Husbandry — the All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;  
**e-mail:** [a.n.ovcharova@mail.ru](mailto:a.n.ovcharova@mail.ru)

**Белова Надежда Викторовна**, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;  
e-mail: [navikbel@mail.ru](mailto:navikbel@mail.ru)

**Nadezhda V. Belova**, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals — Branch of the Federal Science Center for Animal Husbandry — the All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;  
e-mail: [navikbel@mail.ru](mailto:navikbel@mail.ru)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



## ВЛИЯНИЕ ЭТОМЕРЗОЛА ФУМАРАТА НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ КРЫС ПРИ ОТРАВЛЕНИИ АЦЕТАТОМ РТУТИ

К.М. Щепеткова<sup>1\*</sup>, Е.Г. Батоцыренова<sup>1,2</sup>, Е.Б. Шустов<sup>2,5</sup>, В.А. Кашуро<sup>1,3,4</sup>,  
А.В. Шарабанов<sup>6</sup>, Н.П. Раменская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический  
медицинский университет» Минздрава России  
194100, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

<sup>2</sup> ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова ФМБА России»  
192019, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена»  
191186, Российская Федерация, Санкт-Петербург, наб. реки Мойки, 48

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»  
199034, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

<sup>5</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный  
химико-фармацевтический университет» Минздрава России  
197376, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

<sup>6</sup> ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»  
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Продление жизни и работоспособного возраста делает проблему последствий воздействия тяжелых металлов на человека особенно актуальной. Последствия могут проявляться как в виде избирательно-повреждения какого-либо органа, системы органов или функции, так и в виде общего нарушения функций ряда систем и органов и организма в целом, в виде «дезинтеграции функций».

Целью исследования явилось изучение нейропротекторного действия этомерзола фумарата после субхронического низкодозового введения ацетата ртути крысам Wistar.

Установлено, что после внутрижелудочного введения водного раствора ацетата ртути в дозе 4 мг/кг в течение 30 дней происходило нарушение процесса обучения, выявленное в тесте УРАИ (условная реакция активного избегания плаванием). Применение исследуемого вещества в дозе 12,5 мг/кг в течение 14 дней оказывало положительное действие на долговременную память животных, способствуя сохранению и воспроизведению полученной информации.

**Ключевые слова:** когнитивные функции, ацетат ртути, условная реакция активного избегания плаванием, субхроническое отравление

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

**Для цитирования:** Щепеткова К.М., Батоцыренова Е.Г., Шустов Е.Б., Кашуро В.А., Шарабанов А.В., Раменская Н.П. Влияние этомерзола фумарата на когнитивные функции крыс при отравлении ацетатом ртути. *Биомедицина*. 2023;19(3E):124–129. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-124-129>

Поступила 28.04.2023

Принята после доработки 31.07.2023

Опубликована 06.11.2023

## INFLUENCE OF ETOMERSOL FUMARATE ON COGNITIVE FUNCTIONS OF RATS DURING MERCURY ACETATE POISONING

Kristina M. Shchepetkova<sup>1,\*</sup>, Ekaterina G. Batotsyrenova<sup>1,2</sup>, Evgeny B. Shustov<sup>2,5</sup>,  
Vadim A. Kashuro<sup>1,3,4</sup>, Andrey V. Sharabanov<sup>6</sup>, Natalya P. Ramenskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health Care of Russia  
194100, Russian Federation, St. Petersburg, Litovskaya Str., 2

<sup>2</sup> Scientific and Clinical Center of Toxicology named after S.N. Golikov  
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia  
192019, Russian Federation, St. Petersburg, Bekhterev Str., 1

<sup>3</sup> Herzen Russian State Pedagogical University  
191186, Russian Federation, St. Petersburg, Moika River Embankment, 48

<sup>4</sup> Saint Petersburg State University  
199034, Russian Federation, St. Petersburg, Universitetskaya Embankment, 7–9

<sup>5</sup> St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professor Popov Str., 14A

<sup>6</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

Research into the consequences of human exposure to heavy metals acquires particular significance in the context of life and working age prolongation. Such consequences can be manifested either in the form of selective damage to any organ, organ system or function, or in the form of a general violation of the functions of a number of systems and organs and the organism as a whole, in the form of “disintegration of functions”. In this work, we set out to study the neuroprotective effect of etomerzol fumarate after a subchronic low-dose administration of mercury acetate to Wistar rats. After an intragastric administration of an aqueous solution of mercury acetate at a dose of 4 mg/kg for 30 days, a violation of the learning process was identified in an active avoidance by swimming test. The use of the test substance at a dose of 12.5 mg/kg for 14 days had a positive effect on the long-term memory of animals, contributing to the preservation and reproduction of mercury information received.

**Keywords:** cognitive functions, mercury acetate, conditioned reaction of active avoidance by swimming, subchronic poisoning

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

**For citation:** Shchepetkova K.M., Batotsyrenova E.G., Shustov E.B., Kashuro V.A., Sharabanov A.V., Ramenskaya N.P. Influence of Etomersol Fumarate on Cognitive Functions of Rats During Mercury Acetate Poisoning. *Journal Biomed.* 2023;19(3E):124–129. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-124-129>

Submitted 28.04.2023

Revised 31.07.2023

Published 06.11.2023

### Введение

Ртуть относится к наиболее опасным высокотоксичным веществам, поражающим центральную нервную систему (ЦНС). Нарушения высшей нервной деятельности проявляются у экспериментальных животных изменением выработки условных

рефлексов, эмоционально-ассоциативного поведения, двигательной активности и т.д. Для фармакологической коррекции когнитивных нарушений, вызванных воздействием нейротоксикантов, широко используются препараты, которые способствуют обезвреживанию продуктов перекисного

окисления липидов (ПОЛ), утилизации активных форм кислорода, а также оказывают антигипоксантное действие [2]. В качестве потенциального нейропротектора большой интерес представляет фумаровая соль этоксиэтилтиобензимидазола (этомерзола фумарат). В экспериментальных исследованиях установлены антиоксидантные свойства фумарата этомерзола при токсических нагрузках [3].

**Целью исследования** явилось изучение влияния фумарата этомерзола на когнитивные способности лабораторных животных в тесте УРАИ после субхронического низкодозового воздействия ацетатом ртути.

### Материалы и методы

Исследование выполнено на самцах крыс Wistar возрастом 2 мес. массой 160–200 г, полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.) и прошедших карантин в течение 14 дней. Животные содержались на базе «Испытательного центра доклинических исследований» ФГБУ «НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России» в соответствии с международными требованиями. В помещениях вивария поддерживалась температура воздуха 20–25°C и относительная влажность 50–65% при световом режиме день/ночь 12/12. Перед началом исследования животные были распределены на 3 группы с помощью рандомизации. Животные 1-й группы (контрольная) получали ежедневно внутрижелудочно 1 мл дистиллированной воды в течение всего срока исследования; 2-й группе 30 дней вводили внутрижелудочно ацетат ртути (ч.д.а., 0,08% водный р-р) в дозе 4 мг/кг, а затем в течение 14 дней — дистиллированную воду в объеме 1 мл; 3-я группа получала ацетат ртути в течение 30 дней в той же дозе, а затем 14 дней — препарат фармакологической коррекции. Для фармакологической коррекции субхронического отравления ацетатом ртути была использована

фумаровая соль этоксиэтилтиобензимидазола (этомерзола фумарат, ч.д.а.), синтезированная на кафедре органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета. Животным 3-й группы терапию проводили, используя 0,25% водный р-р этомерзола фумарата внутрижелудочно однократно в дозе 12,5 мг/кг в течение 14 дней.

В течение всего эксперимента животных содержали в клетках по 10 особей при свободном доступе к корму и питьевой воде. На 31-й день после введения токсиканта у животных проводились нейрофизиологические исследования согласно стандартным операционным процедурам, разработанным в «Испытательном центре доклинических исследований» ФГБУ «НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России» под контролем ветеринарного врача испытательного центра.

Для оценки нарушений функций ЦНС при субхроническом воздействии ацетатом ртути использовали тест УРАИ (условная реакция активного избегания плаванием). Методика оценки умственной работоспособности по тесту УРАИ предназначена для оценки специфической активности препарата по его способности влиять на процессы обучения и памяти крыс по скорости выработки условного рефлекса. Выработку этого рефлекса начинали с 44-х сут эксперимента в течение 3 дней. Оценивали время выхода животных из воды на стержень (латентный период). Для определения степени нарушения обучаемости животных сравнивали время активного избегания плаванием между группами в течение периода тестирования.

### Результаты и их обсуждение

Результаты исследования когнитивных функций экспериментальных животных после 30-дневного введения ацетата ртути представлены в таблице.

Оценка состояния выработки УРАИ плавания предварительно не тренированных крыс

**Таблица.** Влияние этомерзола фумарата на когнитивные функции в тесте УРАИ, n=10

**Table.** The effect of etomerzol fumarate on cognitive functions in the URAI test, n=10

Экспериментальная группа	Усреднённый латентный период, сек		
	1 сут	2 сут	3 сут
Контрольная группа	41,2±7,7	30,5±13,6	16,4±4,2
% снижения общего времени плавания	—	↓ 25,9	↓ 16,4
Опытная группа	34,2±5,1	49,0±18,1	36,6±12,8
% снижения общего времени плавания	—	↑ 43,3	↑ 7,0
Этомерзол, 12,5 мг/кг	52,3±15,1	23,2±11,7	10,8±5,2
% снижения общего времени плавания	—	↓ 55,6	↓ 79,3

позволяет выявить динамику приобретения навыка избегания при повторных тестированиях реакции и тем самым изучать влияние токсических агентов собственно на процесс обучения экспериментальных животных. В ходе обучения животных, подвергшихся субхроническому низкодозовому воздействию ацетатом ртути, наблюдалось увеличение общего времени плавания: на 2-е сут — на 43,3%, на 3-и сут — на 7%. Таким образом, субхроническое отравление ацетатом ртути приводило к нарушению процесса приобретения навыка, о чём свидетельствовало достоверное увеличение времени нахождения стержня крысами в течение 3-х сут.

Применение этомерзола фумарата линейно снижало время нахождения стержня: на 2-е сут — на 55,6%, на 3-и сут — на 79,3%, что свидетельствует об улучшении процессов извлечения памятного следа.

Таким образом, курсовое применение препарата фумаровой соли этоксиэтилтиобензидазола позволило устранить выявленное нарушение когнитивных функций у отравленных ацетатом ртути экспериментальных животных. Позитивный эффект препарата

связан с антиоксидантным действием этоксиэтилтиобензидазола, что улучшает пластичность нейрональных мембран [3]. Входящий в состав разработанного препарата фумарат оказывает антигипоксическое действие, особенно в условиях выраженной гипоксии [1]. В сумме перечисленные эффекты обеспечивают повышение запоминания и воспроизведения полученной информации.

## Выводы

1. Результаты проведённого исследования показали, что субхроническое отравление ацетатом ртути приводило к нарушению процесса воспроизведения навыка, о чём свидетельствовало достоверное увеличение времени нахождения стержня крысами в течение 3-х сут в тесте УРАИ плавания.

2. Фумаровая соль этоксиэтилтиобензидазола способствует сохранению и воспроизведению полученной информации. Таким образом, проведённое исследование свидетельствует о нейропротекторном и ноотропном действии препарата на фоне субхронического отравления ацетатом ртути.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Болотова В.Ц., Болотина Ю.Д., Шустов Е.Б. Влияние этилтиобензидазола фумарата на физическую работоспособность мышей в условиях одновременного гипоксического и гипертермического воздействия. *Биомедицина*. 2021;17(3E):139–143. [Bolotova V.Ts., Bolotina Yu.D., Shustov E.B. Vliyaniye etiltiobenzimidazola fumarata na fizicheskuyu rabotospobnost' myshei v usloviyakh odnovremennogo gipoksicheskogo i gipertermicheskogo vozdeystviya] [Effect of Ethylthiobenzimidazole Fumarate on the Physical Performance of Mice under Conditions of Simultaneous Hypoxic and Hyperthermal Exposure]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(3E):139–143. (In Russian). DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-139-143.



2. Головки А.И., Батоцыренова Е.Г., Комов Ю.В., Хальчицкий С.Е., Кашуро В.А. Обзор лекарственных препаратов для коррекции нарушений ЦНС, развившихся в результате действия нейротоксикантов. *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. 2022;23(1):385–419. [Golovko A.I., Batotsyrenova E.G., Komov Yu.V., Khalchitsky S.E., Kashuro V.A. Obzor lekarstvennykh preparatov dlya korrektsii narushenii CNS, razvivshihся v rezultate deystviya neyrotoksikantov [Review of drugs for the correction of CNS disorders developed as a result of the action of neurotoxicants]. *Medline.ru. Rossiyskiy biomeditsinskiy zhurnal* [Medline.ru. Russian Biomedical Journal]. 2022; 23(1):385–419. (In Russian)].
3. Щепеткова К.М., Кашуро В.А., Шустов Е.Б., Батоцыренова Е.Г., Красникова Е.Н. Влияние этомерзола фумарата на антиоксидантную систему и перекисное окисление липидов эритроцитов крыс при отравлении ацетатом ртути. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2022;4:31–37. [Shchetkova K.M., Kashuro V.A., Shustov E.B., Batotsyrenova E.G., Krasnikova E.N. Vliyanie jetomerzola fumarata na antioksidantnuju sistemu i perekisnoe okislenie lipidov jericitocitov kryс pri otravlenii acetatom rtuti [The effect of ethomerzol fumarate on the antioxidant system and lipid peroxidation of rat erythrocytes during mercury acetate poisoning]. *Laboratornye zhivotnye dlja nauchnyh issledovanij* [Laboratory animals for scientific research]. 2022;4:31–37. (In Russian)]. DOI: 10.57034/2618723X-2022 04 04.

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Щепеткова Кристина Михайловна\***, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;  
**e-mail:** [tesh\\_07@inbox.ru](mailto:tesh_07@inbox.ru)

**Kristina M. Shchetkova\***, Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
**e-mail:** [tesh\\_07@inbox.ru](mailto:tesh_07@inbox.ru)

**Батоцыренова Екатерина Геннадьевна**, к.б.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова ФМБА России»;  
**e-mail:** [bkaterina2009@yandex.ru](mailto:bkaterina2009@yandex.ru)

**Ekaterina G. Batotsyrenova**, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health Care of Russia, Scientific and Clinical Center of Toxicology named after S.N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [bkaterina2009@yandex.ru](mailto:bkaterina2009@yandex.ru)

**Шустов Евгений Борисович**, д.м.н., проф., ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова ФМБА России», ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России;  
**e-mail:** [shustov-msk@mail.ru](mailto:shustov-msk@mail.ru)

**Evgeny B. Shustov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific and Clinical Center of Toxicology named after S.N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
**e-mail:** [shustov-msk@mail.ru](mailto:shustov-msk@mail.ru)

**Кашуро Вадим Анатольевич**, д.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;  
**e-mail:** [kashuro@yandex.ru](mailto:kashuro@yandex.ru)

**Vadim A. Kashuro**, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health Care of Russia, Herzen Russian State Pedagogical University, Saint Petersburg State University;  
**e-mail:** [kashuro@yandex.ru](mailto:kashuro@yandex.ru)

**Шарабанов Андрей Вячеславович**, ФГБУН  
«Научный центр биомедицинских технологий  
ФМБА России»;

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

**Andrey V. Sharabanov**, Scientific Center of  
Biomedical Technologies of the Federal Medical  
and Biological Agency of Russia;

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

**Раменская Наталья Петровна**, к.б.н., доц.,  
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государст-  
венный педиатрический медицинский универ-  
ситет» Минздрава России;

**e-mail:** [n\\_ramenskaia@mail.ru](mailto:n_ramenskaia@mail.ru)

**Natalya P. Ramenskaya**, Cand. Sci. (Biol.), Assoc.  
Prof., Saint Petersburg State Pediatric Medical  
University of the Ministry of Health Care of Russia;

**e-mail:** [n\\_ramenskaia@mail.ru](mailto:n_ramenskaia@mail.ru)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



## ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ И СПОСОБЫ ТЕРАПИИ АКВАГЕННОЙ КРАПИВНИЦЫ

О.М. Куделина\*, Е.В. Ганцгорн, Ю.С. Макляков, Д.Л. Ткаченко, Л.А. Авакян,  
П.А. Чубырева, У.Г. Амирова, Ю.А. Карпова, А.Н. Дульская, И.Б. Месхи

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

Аквагенная крапивница — одна из наиболее редких форм аллергической реакции организма. Клинически проявляется зудом, уртикарными высыпаниями спустя 5–10 мин после контакта с водой и их исчезновением в течение 30–60 мин. Базисная терапия включает назначение блокаторов H1-гистаминовых рецепторов II поколения и барьерных кремов с церамидами. В последние годы рассматривается применение терапии моноклональными антителами (омализумаб) в случае неэффективности антигистаминных препаратов.

**Ключевые слова:** аквагенная крапивница, хроническая индуцированная крапивница, блокаторы H1-гистаминовых рецепторов, омализумаб

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

**Для цитирования:** Куделина О.М., Ганцгорн Е.В., Макляков Ю.С., Ткаченко Д.Л., Авакян Л.А., Чубырева П.А., Амирова У.Г., Карпова Ю.А., Дульская А.Н., Месхи И.Б. Особенности клинического течения и способы терапии аквагенной крапивницы. *Биомедицина*. 2023;19(3E):130–135. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-130-135>

Поступила 27.04.2023

Принята после доработки 05.05.2023

Опубликована 06.11.2023

## CLINICAL COURSE AND THERAPY METHODS OF AQUAGENIC URTICARIA

Oksana M. Kudelina\*, Elena V. Gantsgorn, Yuri S. Maklyakov, Darya L. Tkachenko,  
Lilia A. Avakyan, Polina A. Chubyreva, Yliana G. Amirova, Yulia A. Karpova,  
Alina N. Dulskaya, Irakly B. Meshi

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

Aquagenic urticaria is one of the rarest forms of allergic reaction in the body. Aquagenic urticaria is clinically manifested by itching and urticarial rashes 5–10 min after contact with water. The signs disappear within 30–60 min. The standard therapy regimen includes the administration of second-generation H1-histamine receptor blockers and barrier creams with ceramides. In recent years, the use of monoclonal antibody therapy (omalizumab) has been considered in cases where antihistamines are ineffective.

**Keywords:** aquagenic urticaria, chronic inducible urticaria, H1-antihistamines, omalizumab

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

**For citation:** Kudelina O.M., Gantsgorn E.V., Maklyakov Yu.S., Tkachenko D.L., Avakyan L.A., Chubyreva P.A., Amirova Y.G., Karpova Yu.A., Dulskaya A.N., Meshi I.B. Clinical Course and Therapy Methods of Aquagenic Urticaria. *Journal Biomed*. 2023;19(3E):130–135. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-19-3E-130-135>

Submitted 27.04.2023

Revised 05.05.2023

Published 06.11.2023

## **Аквагенная крапивница как форма хронической индуцированной крапивницы**

Крапивница — группа заболеваний, характеризующаяся развитием зудящих бледно-розовых волдырей и/или ангиоотечков, напоминающих ожог крапивы. В зависимости от длительности и частоты эпизодов крапивница может протекать в виде острой и хронической форм [1].

Хроническая индуцированная крапивница (ХИК) классифицируется по подтипам: *физическая*: дермографическая, холодовая, замедленная крапивница от давления, солнечная, тепловая, вибрационная; *нефизическая*: холинергическая, контактная, аквагенная.

Аквагенная крапивница (АК) — крайне редкая форма ХИК, при которой контакт с водой любой температуры приводит к появлению на коже пациента высыпаний в виде мелких зудящих волдырей диаметром 1–3 мм, окруженных эритемой до 3 см. Элементы появляются в течение 5–10 мин после контакта с водой или любыми физиологическими жидкостями (слезы, пот, слюна и др.) и, как правило, исчезают через 30–60 мин после прекращения воздействия [4].

### **Распространенность аквагенной крапивницы в популяции**

АК является редким аллергическим заболеванием, поэтому достоверные статистические данные по его эпидемиологии на сегодня отсутствуют. Однако попытки оценить распространенность крапивницы все же были. Распространенность острой формы крапивницы составляет около 20%, среди детского населения — 2,1–6,7%, при этом у детей она встречается чаще, чем у взрослых [1]. Согласно публикации [2], хронической крапивницей страдает 0,5–

1% людей в общей популяции, при этом на долю ХИК приходится 6–30% всех случаев, из которых до 1,2% составляет АК.

### **Вероятные механизмы патогенеза аквагенной крапивницы**

Патогенез АК до конца не изучен. Наиболее распространенными гипотезами являются следующие [7].

1. При контакте себума с водой образуется вещество, вызывающее дегрануляцию тучных клеток и освобождение гистамина, что приводит к образованию волдырей.

2. При контакте кожи с водой водорастворимые эпидермальные антигены диффундируют через дерму и вызывают дегрануляцию тучных клеток с последующим высвобождением гистамина.

3. Гистамин-независимый механизм.

4. Изменение осмотического давления вокруг волосяных фолликулов вызывает усиление пассивной диффузии воды, косвенно провоцируя крапивницу.

### **Современные подходы к диагностике аквагенной крапивницы**

Диагностика АК основывается на данных анамнеза, жалобах пациента, а также результатах объективных исследований. При сборе анамнеза обращают внимание на размер, локализацию, характер высыпаний, наличие зуда, а также цикличность возникновения и исчезновения симптомов. Проводятся также лабораторные анализы, но очень часто результаты остаются в пределах нормы [8].

Существует ряд специфических тестов для диагностики АК, среди которых ведущую роль занимают кожные провокационные пробы. Для исключения реакции на холод или тепло используется наложение водного компресса температурой 36–37°C

на 5–30 мин. Уртикарные высыпания появляются в месте контакта с водой в течение 10–20 мин. Помимо водопроводной воды, для компрессов используются дистиллированная вода, гипертонический р-р NaCl и 20% р-р глюкозы. У пациентов с «классическим» вариантом течения АК может наблюдаться реакция только на воду, тогда как кожа под компрессами, смоченными растворами NaCl и глюкозы, остается интактной. При солезависимом варианте АК отмечается кожная реакция только при воздействии компрессов с гипертоническим раствором NaCl [6].

В случае, описанном в работе [5], отмечались нетипичные реакции на провокационные тесты. Водная провокационная проба, при которой использовался контакт всего тела с мокрой одеждой, способствовала появлению лишь нескольких высыпаний. В то же время после душа наблюдались множественные точечные волдыри, окруженные эритемой.

### **Разнообразие клинических проявлений аквагенной крапивницы**

Волдыри при АК могут возникать на любой поверхности кожи, контактирующей с водой, но наиболее часто — на тыльной поверхности кистей, в области лица и зоны декольте.

У пациентки, упоминаемой в работе [7], были зарегистрированы относительно легкие проявления АК. После контакта с водой у женщины возникали волдыри, которые исчезали в течение 60 мин. Прикладывание влажных компрессов не вызывало никакой реакции, в отличие от полного погружения рук в воду, при котором появлялись волдыри в местах контакта кожи с водой.

В работе [8] обследовали женщину с ладонно-подошвенной формой АК. При проведении провокационных тестов с применением воды у пациентки появились волдыри исключительно на коже ладоней и подошв,

тогда как на предплечье сыпь отсутствовала. В качестве терапии был выбран гидроксизин (10 мг на ночь) + смягчающий крем. Спустя 1 мес. пациентка сообщила об облегчении только после применения смягчающего средства даже при отсутствии антигистаминного препарата, прием которого затем был прекращен.

В статье [6] описан случай АК у 16-летнего японца, который более 2-х лет жаловался на повторяющиеся эпизоды высыпаний, возникавших через 5–10 мин после контакта с водой: дождь, душ, пот. Сыпь была представлена плоскими или слегка возвышающимися над уровнем кожи волдырями со слабой эритемой до 5 см в диаметре на плечах, руках и туловище и сопровождалась зудом. Элементы часто сливались и в течение 10–20 мин исчезали. При диагностике у подростка были выявлены положительная проба на лёд, что подтвердило возможность сочетания АК с другими видами хронической крапивницы.

### **Современные подходы к терапии аквагенной крапивницы**

В настоящее время в терапии АК препаратами выбора являются H1-гистаминоблокаторы II поколения. При низкой эффективности средних терапевтических доз допускается максимальное 4-кратное увеличение дозы [2, 7].

Положительные эффекты оказывают кремы с церамидами (Церафавит, Атокальм и др.), которые участвуют в поддержании липидного барьера кожи, клеточной адгезии, пролиферации и апоптозе эпидермиса. При их использовании повышается гидратация кожи и снижается потеря влаги [7, 8].

При неэффективности предшествующей терапии в течение 2–4 недель может быть использован препарат, являющийся рекомбинантным гуманизированным анти-IgE-антителом, — омализумаб, однако в России в связи с его высокой стоимостью он используется

редко. При этом в литературе присутствуют сведения о высокой эффективности омализумаба при АК, в т.ч. о сохранении эффекта не только во время курса терапии, но и в течение 2 мес. после его окончания [7, 8].

У пациентки, исследуемой в работе [4], во время купания в прохладной морской воде случился первый эпизод АК, который прекратился после согревания. Далее присоединились ангионевротический отек, одышка и головокружение после воздействия холодного ветра. Первая доза омализумаба (300 мг) обеспечила значительное облегчение, курс состоял из 6 инъекций. Через 10 мес. после окончания курса у пациентки наблюдалась ремиссия.

В исследовании [3] омализумаб использовали в качестве терапии ХИК различных подтипов. После курса применения препарата у двух пациентов с АК наблюдалась положительная динамика.

## Заключение

В представленной работе проведен обзор актуальных публикаций, касающихся течения редкой формы аллергической реакции немедленного типа — аквагенной крапивницы, и выявлен ряд особенностей, которые в дальнейшем позволят улучшить

качество диагностики и лечения данного заболевания.

Для диагностики определяющее значение имеют водные провокационные пробы, представляющие собой прикладывание смоченных компрессов с экспозицией около 20–30 мин. При этом лабораторные показатели в большинстве случаев оказываются в пределах нормы.

В качестве базисной терапии АК используются блокаторы H1-гистаминовых рецепторов II поколения, доза которых при необходимости может быть увеличена до 4-х раз. В тяжелых случаях возможно применение препарата моноклональных антител IgE — омализумаба. Однако не все пациенты в полном объеме «отвечают» на данную фармакотерапию. Положительная динамика наблюдается также при использовании барьерных средств — кремов с церамидами, которые в одном из представленных случаев выступали в качестве монотерапии. Таким образом, дальнейшие наблюдения и изучение редкой формы хронической индуцированной крапивницы — аквагенной крапивницы — необходимы не только с целью своевременной диагностики, но и для поиска новых подходов к терапии данного заболевания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. *Крапивница. Клин. реком.* Российское общество дерматовенерологов и косметологов, Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов. М., 2020. [*Krapivnica. Klin. Rekom. [Clinical guidelines: urticarial]*]. Russian Society of Dermatovenerologists and Cosmetologists, Russian Association of Allergology and Clinical Immunology. Moscow, 2020. (In Russian).
2. Скандер Д.М., Алленова А.С., Колхир П.В. Хроническая индуцированная крапивница: алгоритм лечения. *Лечащий врач.* 2018;7:68–71. [Skander D.M., Allenova A.S., Kolkhir P.V. Chronicheskaya inducirovannaya krapivnica: algoritm lecheniya [Chronic induced urticaria: a treatment algorithm]. *Lechashii vrach [Attending doctor]*. 2018;7:68–71. (In Russian)].
3. Aşkın Ö., Bayazit S., Ferhatoglu Z. A., Engin, B. The Efficacy of Omalizumab Therapy in Chronic Inducible Urticaria. *Age.* 2022;36:17–55.
4. Bumbăcea R.S., Deaconu C.G., Berghea E.C. Management problems in severe chronic inducible urticaria: Two case reports. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2019;18(2):960–963.
5. Chen Y.C., Hsu W.H., Sun C.M., Liu C.H. A case of aquagenic urticaria with a brief review of the literature. *Dermatologica sinica.* 2018;36(3):146–148.
6. Fukayama M., Domoto Y., Sato S., Asano Y. Case of aquagenic urticaria: Case report and the results of histopathological examination. *The J. of Dermatology.* 2021;48(1):88–91.

7. Robles-Tenorio A., Tarango-Martinez V.M., Sierra-Silva G. Aquagenic urticaria: Water, friend, or foe? *Clinical Case Reports*. 2020;8(11):2121–2124.
8. Srivastava P.R., Vaggu A.K., Kasoju S., Khare J. Pal-moplar tar aquagenic urticaria: A case report. *Indian J. of Dermatology, Venereology and Leprology*. 2017;83(5):583–592.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Куделина Оксана Михайловна\***, к.м.н.,  
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный ме-  
дицинский университет» Минздрава России;  
e-mail: [kuomi81@mail.ru](mailto:kuomi81@mail.ru)

**Oksana M. Kudelina\***, Cand. Sci. (Med.), Rostov  
State Medical University of the Ministry of Health  
Care of Russia;  
e-mail: [kuomi81@mail.ru](mailto:kuomi81@mail.ru)

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

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

**Макляков Юрий Степанович**, д.м.н., проф.,  
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный ме-  
дицинский университет» Минздрава России;  
e-mail: [maklus005@gmail.com](mailto:maklus005@gmail.com)

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

**Ткаченко Дарья Леонидовна**, ФГБОУ ВО  
«Ростовский государственный медицинский  
университет» М инздрава России;  
e-mail: [t\\_darya2301@mail.ru](mailto:t_darya2301@mail.ru)

**Darya L. Tkachenko**, Rostov State Medical  
University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [t\\_darya2301@mail.ru](mailto:t_darya2301@mail.ru)

**Авакян Лилия Ашотовна**, ФГБОУ ВО «Ростов-  
ский государственный медицинский универси-  
тет» Минздрава России;  
e-mail: [lilyforever02@mail.ru](mailto:lilyforever02@mail.ru)

**Lilia A. Avakyan**, Rostov State Medical University  
of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [lilyforever02@mail.ru](mailto:lilyforever02@mail.ru)

**Чубырева Полина Алексеевна**, ФГБОУ ВО  
«Ростовский государственный медицинский  
университет» Минздрава России;  
e-mail: [chubyrevapolina@mail.ru](mailto:chubyrevapolina@mail.ru)

**Polina A. Chubyreva**, Rostov State Medical  
University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [chubyrevapolina@mail.ru](mailto:chubyrevapolina@mail.ru)

**Амирова Ульяна Газиевна**, ФГБОУ ВО «Рос-  
товский государственный медицинский универ-  
ситет» Минздрава России;  
e-mail: [amirova.yliana@mail.ru](mailto:amirova.yliana@mail.ru)

**Yliana G. Amirova**, Rostov State Medical Uni-  
versity of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [amirova.yliana@mail.ru](mailto:amirova.yliana@mail.ru)

**Карпова Юлия Александровна**, ФГБОУ ВО  
«Ростовский государственный медицинский  
университет» Минздрава России;  
e-mail: [yulka171102@gmail.com](mailto:yulka171102@gmail.com)

**Yulia A. Karpova**, Rostov State Medical University  
of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [yulka171102@gmail.com](mailto:yulka171102@gmail.com)

**Дульская Алина Николаевна**, ФГБОУ ВО  
«Ростовский государственный медицинский  
университет» Минздрава России

**Alina N. Dulskaya**, Rostov State Medical Uni-  
versity of the Ministry of Health Care of Russia

**Месхи Иракли Бесикович**, ФГБОУ ВО «Рос-  
товский государственный медицинский универ-  
ситет» Минздрава России

**Irakly B. Meshi**, Rostov State Medical University  
of the Ministry of Health Care of Russia

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



