

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

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

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) **21**
2025

1



Уважаемые коллеги!

Приглашаем вас принять участие
в **XXI ежегодной научно-практической конференции**
«Биомедицина и биомоделирование», которая будет проводиться
21–22 мая 2025 г. в Научном центре
биомедицинских технологий ФМБА России по адресу:
Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1;
тел.: (495) 587-20-55; e-mail: oga@scbmt.ru

Секции конференции:

- методы, технологии и биотехнологии в биомедицине;
- доклинические исследования в биомедицине;
- генетические модификации и критерии качества биомоделей.

Участие в конференции предполагается в двух форматах: традиционном и заочном. Время для доклада на пленарном заседании – 20 мин, на секциях – 10 мин. Возможно представление стендовых докладов.

В рамках конференции проводятся секции молодых учёных и студентов.

Участие в конференции бесплатное, расходы на проезд и проживание – за счет командирующих организаций.

Срок подачи заявки на участие и материалов – **до 15 апреля 2025 г.**

Оргкомитет обращает внимание, что материалы на конференцию принимаются в виде кратких сообщений (*завершённый оригинальный фрагмент работы, не более 4 стр., до 15 ссылок*) с указанием фамилии, имени, отчества, учреждения и названия доклада. Оформление материалов – в соответствии с правилами для авторов, опубликованными на сайте журнала «Биомедицина» <https://journal.scbmt.ru/jour/about/submissions#authorGuidelines>, согласно размещённому образцу.

Работы, получившие положительные рецензии и одобренные редколлегией, будут опубликованы в журнале «Биомедицина».



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2025, Том 21, № 1

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

JOURNAL BIOMED

SCIENTIFIC JOURNAL

Published since 2005.
Quarterly

2025, Vol. 21, No. 1

БИОМЕДИЦИНА

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

■ Главный редактор

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

■ Заместители главного редактора

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

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н.

■ Ответственный секретарь

Алимкина Оксана Владимировна

■ Члены редакционного совета

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Николенко Владимир Николаевич, д.м.н., проф. (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

БИОМЕДИЦИНА

История издания журнала:	Журнал издается с 2005 г.
Периодичность:	4 выпуска в год
Префикс DOI:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Свидетельство о регистрации СМИ:	Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати. Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324 от 09.06.2005
Индексация:	Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук
Подписной индекс:	57995 в объединенном каталоге «Пресса России»
Стоимость одного выпуска:	400 руб.
Условия распространения материалов:	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License
Учредитель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Издатель:	ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» 143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1
Редакция:	143442, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1 Тел.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Тираж:	3000 экземпляров
Типография:	ООО «МЕДИАКОЛОП» 127273, Москва, Сигнальный пр-д, 19, стр. 1
Дата выхода в свет:	10.03.2025

JOURNAL BIOMED

Biomeditsina

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)
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.), Acad. 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)
Aleksandr E. Kuznetsov, Dr. Sci. (Tech.), Prof. (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)
Vladimir N. Nikolenko, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)
Sergey V. Okovityy, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Saint Petersburg, Russia)
Konstantin S. Ostrenko, Dr. Sci. (Biol.) (Borovsk, Kaluga Region, Russia)
Vsevolod G. Pinelis, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)
Sergey Yu. Pchelintsev, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Lyubuchany, Moscow Region, Russia)
Galina V. Ramenskaya, Dr. Sci. (Pharm.), Prof. (Moscow, Russia)
Vladimir R. Rembovsky, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Kuzmolovskiy, Leningrad Region, Russia)
Igor V. Reshetov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)
Andrey V. Safronenko, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Rostov-on-Don, Russia)
Dmitriy A. Sychev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. of the RAS (Moscow, Russia)
Liliya V. Fedulova, Dr. Sci. (Tech.), Prof. of the RAS (Moscow, Russia)
Dmitriy F. Khritinin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. 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

Biomeditsina

Founded:	The journal has been published since 2005.
Frequency:	Quarterly
DOI Prefix:	10.33647
ISSN	2074-5982 (Print) 2713-0428 (Online)
Mass media registration certificate:	Registered at the State Committee of the Russian Federation on Press under the number ПИ № ФС77-21324 of 09.06.2005
Indexing:	The Journal is included into the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading per-reviewed scientific journals recommended for publishing the basic research results of doctor and candidate theses)
Subscription index:	57995 in the combined catalogue "Pressa Rossii"
Price:	400 RUR
Content distribution terms:	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License
Founders:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye gory Village, 1
Publisher:	Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia 143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye gory Village, 1
Editorial office:	143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye gory Village, 1 Tel.: +7 (495) 561-52-64 E-mail: info@scbmt.ru , scbmt@yandex.ru
Circulation:	3000 copies
Printing house:	MediaColor LLC 127273, Russian Federation, Moscow, Signalny proezd, 19
Publication date:	10.03.2025

■ ГЕНЕТИКА И ЭПИГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ-БИОМОДЕЛЕЙ

**И.А. Помыткин, Н.С. Огнева, Н.В. Петрова, Ю.В. Фокин, В.В. Слободенюк,
Н.А. Леднева, В.Н. Каркищенко**

Лейтрагин повышает транскрипцию гена *Сиртуин 6*
в условиях острого воспаления легких у мышей 8

■ БИОТЕХНОЛОГИИ В БИОМЕДИЦИНЕ

**Д.С. Мартынова, А.В. Солдатенкова, А.А. Калошин, С.А. Лазарев,
О.М. Афанасьева, Н.А. Михайлова**

Оптимизация очистки антигенных комплексов *Klebsiella pneumoniae*
методом диафильтрации от гидроксилamina 18

А.С. Минеро, О.Б. Рунова, О.В. Фадейкина, Р.А. Волкова, О.Б. Устинникова

Разработка стандартного образца для количественной оценки
стабилизаторов углеводной природы методом ионообменной ВЭЖХ. 26

■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

А.А. Мокрушин

Эффекты высоких концентраций D-глюкозы на активность АМПА и НМДА
рецепторов при моделировании гипергликемии на срезах мозга 34

**С.С. Тимонова, И.А. Кирик, Д.Т. Зарипова, Р.И. Фарсиева, И.А. Каргополов,
Р.Л. Анисимов, А.А. Пискунов, Р.А. Хамитов**

Сравнение продуцентов афлиберцепта, полученных
на основе клеточных линий CHO и CHO-GS 46

■ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

Н.Э. Струпуль, В.Е. Силантьев, Т.Г. Боровская, Н.В. Пучкова, Е.Л. Соболева

Влияние селенобогатенной ламинарии на продуктивность
сперматогенеза крыс на фоне экспериментальной модели патоспермии. 58

■ GENETICS AND EPIGENETICS OF ANIMAL BIOMODELS

- Igor A. Pomytkin, Nastasya S. Ogneva, Nataliya V. Petrova, Yuriy V. Fokin, Vladimir V. Slobodenyuk, Nadezhda A. Ledneva, Vladislav N. Karkischenko**
Leitragin Increases Transcription of *Sirtuin 6* Gene under Conditions of Acute Lung Inflammation in Mice 8

■ BIOTECHNOLOGIES IN BIOMEDICINE

- Daria S. Martynova, Alena V. Soldatenkova, Alexei A. Kaloshin, Sergey A. Lazarev, Olga M. Afanasyeva, Natalia A. Mikhailova**
Effect of Washing Solutions on Diafiltration Efficiency and Properties of *Klebsiella pneumoniae* Antigenic Complexes 18

- Anastasia S. Minero, Olga B. Rounova, Olga V. Fadeikina, Rauza A. Volkova, Olga B. Ustinnikova**
Certified Reference Material for Quantitative Evaluation of Carbohydrate Stabilizers by Ion Exchange HPLC 26

■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

- Anatoliy A. Mokrushin**
Effects of Elevated D-Glucose Concentrations on AMPA and NMDA Receptor Activity in Modeled Hyperglycemia in Brain Slices 34

- Sofya S. Timonova, Inessa A. Kirik, Dolia T. Zaripova, Regina I. Farsieva, Ivan A. Kargopolov, Roman L. Anisimov, Alexander A. Piskunov, Ravil A. Khamitov**
Comparison of Aflibercept Producers Derived from CHO and CHO-GS Cell Lines 46

■ NON-CLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE

- Nadezhda E. Struppul, Vladimir E. Silant'ev, Tatyana G. Borovskaya, Natalia V. Puchkova, Ekaterina L. Soboleva**
Effect of Selen-Enriched Laminaria on Rat Spermatogenesis in Modeled Pathospermia. 58



ЛЕЙТРАГИН ПОВЫШАЕТ ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНА СИРТУИН 6 В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЛЕГКИХ У МЫШЕЙ

И.А. Помыткин, Н.С. Огнева*, Н.В. Петрова, Ю.В. Фокин, В.В. Слободенюк,
Н.А. Леднева, В.Н. Каркищенко

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

Сиртуины — НАД-зависимые гистоновые деацетилазы III класса — представлены у млекопитающих семью изоформами, отличающимися друг от друга субстратной селективностью и внутриклеточной локализацией. Ядерные сиртуины 1 (SIRT1) и 6 (SIRT6) деацетилируют компоненты провоспалительных сигнальных путей, играя ключевую роль в разрешении воспаления. Лейтрагин — пептидный агонист δ -опиоидных рецепторов, является представителем нового перспективного класса противовоспалительных препаратов, известный механизм действия которых связан с активацией транскрипции SIRT1. Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния ингаляционного Лейтрагина на транскрипцию всех семи изоформ сиртуина млекопитающих в легких мышей C57BL/6Y в условиях моделирования острого воспаления легких и ОРДС. В работе впервые показано, что ингаляционное введение Лейтрагина статистически значимо повышает транскрипцию SIRT6 в легких в дополнение к уже известному эффекту активации транскрипции SIRT1 в условиях воспаления. Таким образом, настоящая работа уточняет механизм противовоспалительного действия Лейтрагина, который заключается в повышении транскрипции SIRT1 и SIRT6, известных отрицательных регуляторов провоспалительных сигнальных путей, где транскрипционный фактор NF- κ B играет ключевую роль.

Ключевые слова: Лейтрагин, сиртуин 1–6, ядерный фактор κ B, цитокины, мыши C57BL/6Y, острое воспаление легких, ОРДС

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН НЦБМТ ФМБА России по теме «Экспрессия сиртуинов как биомаркер в оценке функциональных состояний лабораторных животных» (шифр: «Сирт-2024»).

Для цитирования: Помыткин И.А., Огнева Н.С., Петрова Н.В., Фокин Ю.В., Слободенюк В.В., Леднева Н.А., Каркищенко В.Н. Лейтрагин повышает транскрипцию гена *Сиртуин 6* в условиях острого воспаления легких у мышей. *Биомедицина*. 2025;21(1):8–17. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-8-17>

Поступила 15.12.2024

Принята после доработки 17.02.2025

Опубликована 10.03.2025

LEITRAGIN INCREASES TRANSCRIPTION OF SIRTUIN 6 GENE UNDER CONDITIONS OF ACUTE LUNG INFLAMMATION IN MICE

Igor A. Pomytkin, Nastasya S. Ogneva*, Nataliya V. Petrova, Yuriy V. Fokin,
Vladimir V. Slobodenyuk, Nadezhda A. Ledneva, 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

Sirtuins are NAD-dependent class III histone deacetylases, represented in mammals by seven isoforms that differ in substrate specificity and intracellular localization. Nuclear sirtuins 1 (SIRT1) and 6 (SIRT6) deacetylate components of pro-inflammatory signaling pathways, playing a key role in the resolution of inflammation. Leitragin, a peptide agonist of δ -opioid receptors, is a representative of a new promising class of anti-inflammatory drugs, whose known mechanism of action is associated with the activation of SIRT1 transcription. The aim of this study was to investigate the effect of inhaled Leitragin on the transcription of all seven isoforms of mammalian sirtuins in the lungs of C57BL/6Y mice under conditions of acute lung inflammation and ARDS modeling. This study is the first to demonstrate that inhalation of Leitragin significantly increases *SIRT6* transcription in the lungs, in addition to the previously known effect of activating *SIRT1* transcription under inflammatory conditions. This work clarifies the anti-inflammatory action of Leitragin, which involves the upregulation of *SIRT1* and *SIRT6* transcription, known negative regulators of pro-inflammatory signaling pathways where the NF- κ B transcription factor plays a key role.

Keywords: Leitragin, sirtuin 6, nuclear factor κ B, cytokines, acute lung inflammation, mice

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

Funding: The work carried out within the framework of the state assignment of the Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia on the topic "Sirtuin expression as a biomarker in assessing the functional states of laboratory animals" (code: "Sirt-2024").

For citation: Pomytkin I.A., Ogneva N.S., Petrova N.V., Fokin Yu.V., Slobodenyuk V.V., Ledneva N.A., Karkischenko V.N. Leitragin Increases Transcription of *Sirtuin 6* Gene under Conditions of Acute Lung Inflammation in Mice. *Journal Biomed.* 2025;21(1):8–17. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-8-17>

Submitted 15.12.2024

Revised 17.02.2025

Published 10.03.2025

Введение

Пептидные агонисты δ -опиоидных рецепторов обладают высокой противовоспалительной активностью и представляют собой новый класс противовоспалительных препаратов, эффективность которых показана как в доклинических, так и клинических исследованиях. В частности, δ -агонист D-Ala2-D-Leu5-энкефалин (DADLE) при внутривенном введении повышал выживаемость крыс в условиях сепсиса, вызванного проколом и лигированием слепой кишки, снижая в крови уровни таких медиаторов воспаления, как фактор некроза опухоли (TNF- α), интерлейкин-1 β (IL1- β) и белок бокс 1 высокой подвижности (HMGB1) [14]. При интравентрикулярном введении DADLE защищал мозг от повреждений, вызванных ишемией-реперфузией, ингибируя провоспалительный сигнальный путь активации ядерного фактора κ B (NF- κ B) и снижая уровни TNF- α и IL1- β в мозге [7]. Агонист δ -опиоидных рецепторов D-Ala2-

динорфин 1-6 (Лейтрагин) при ингаляционном введении повышал выживаемость мышей C57BL/6Y на модели острого повреждения легких (acute lung injury, ALI), вызываемого липополисахаридом, здесь и далее обозначенной как модель острого воспаления легких и респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [1], снижая транскрипцию медиаторов воспаления, таких как интерферон- α (IFN- α) и - β (IFN- β), цитокины TNF- α , IL1- β , интерлейкин-6 (IL-6) [2], а также снижая уровни секреции провоспалительного HMGB1 [9]. В клинических исследованиях Лейтрагин также показал эффективность как противовоспалительный препарат и был зарегистрирован в качестве лекарственного препарата для лечения COVID-19.

Механизм противовоспалительного действия Лейтрагина существенно отличается от механизмов коммерчески доступных противовоспалительных препаратов других классов и включает активацию

транскрипции сиртуина 1 (SIRT1) [9], гистоновой деацетилазы III класса, играющей ключевую роль в разрешении воспаления [15]. Класс III гистоновых деацетилаз млекопитающих включает помимо SIRT1 еще шесть изоформ сиртуинов, в т. ч. сиртуины 2 (SIRT2), 3 (SIRT3), 4 (SIRT4), 5 (SIRT5), 6 (SIRT6) и 7 (SIRT7), которые отличаются друг от друга селективностью к белкам-субстратам и внутриклеточной локализацией [12]. Неизвестно, насколько эффект Лейтрагина на транскрипцию *SIRT1* является селективным, или Лейтрагин также может активировать транскрипцию других изоформ сиртуинов, среди которых *SIRT6* также обладает противовоспалительными свойствами и способен блокировать действие транскрипционного фактора NF-κB, снижая уровень ацетилирования гистона H3K9 [10].

Цель работы — изучить влияние ингаляционного Лейтрагина на транскрипцию всех известных изоформ сиртуина млекопитающих в легких мышей C57BL/6Y в условиях моделирования острого воспаления легких и ОРДС.

Материалы и методы

Расходные материалы

α-Галактоцерамид (α-GalCer) и липополисахарид (LPS) (*E. coli* 055:B5) были приобретены в “Sigma-Aldrich” (“Merck”, США). Гексапептид Лейтрагин (H-Tyr-DAla-Gly-Phe-Leu-Arg-OH диацетат) был приобретён в ООО «Бион» (Россия). Набор РНК-экстран для извлечения РНК был приобретён в ООО «Синтол» (Россия). Набор РЕВЕРТА-Л для синтеза кДНК был получен от ООО «АмплиСенс» (Россия). Золетил 100, седамидин и антиседан были получены от “Virbac” (Франция), “Interchemie” (Нидерланды) и “Orion Pharma” (Финляндия). Все остальные реагенты были приобретены в “Sigma-Aldrich” (“Merck”, США).

Лабораторные животные

Исследования проводились в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России на мышах линии C57BL/6Y, самцах в возрасте 10–12 недель, средней массой 20±2,0 г. Животные были получены из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.) и отобраны в эксперимент методом рандомизации. Мышей содержали в микроизоляторной системе Rair IsoSystem по 6 особей в группе. Животные соответствовали категории улучшенных конвенциональных. В качестве рациона получали стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре воздуха 18–22°C, относительной влажности 60–70% и искусственном освещении с циклом 12/12.

Исследования проводились в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета о защите животных, используемых в научных целях от 22.09.2010; Базельской декларацией (2011); Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; ГОСТ 53434-2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)»; Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»; Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»; Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклини-

ческим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов»; Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [5]; Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [4]. Все эксперименты были одобрены биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Модель острого воспаления лёгких

Животным моделировали острое воспаление легких и ОРДС последовательным введением α -GalCer ингаляционно в дозе 1 мкг/мышь и через 24 ч — липополисахарида *E. coli* в дозе 300 мкг/мышь с добавлением 100 мкг/мышь мурамилпептида и 10 мкл/мышь полного адьюванта Фрейнда, здесь и далее обозначаемой как «LPS», интратрахеально под инъекционным наркозом, состоящим из комбинации препаратов — Золетил 100 («Virbac», Франция) и Медитамидин («Ари-Сан», Россия) в дозе 12,5 и 1 мг/кг соответственно, а также сразу

после проведения хирургической манипуляции вводился Антиседан («Orion Pharma», Финляндия) подкожно в дозе 2,5 мг/кг, что способствовало снятию нежелательных эффектов на организм мыши и быстрому выходу из наркоза.

Группы и введение препаратов

Животные были рандомизированы в две группы по 6 животных в каждой. В контрольной группе животные через 30 мин после инъекции LPS получили 100 мкл физ. р-ра однократной ингаляцией. Во второй группе животные получили 0,1 мг/кг Лейтрагина в виде 100 мкл р-ра с концентрацией 0,02 мкг/мл. Через 30 мин после введения Лейтрагина или физ. р-ра животные были выведены из эксперимента. Образцы ткани легких, извлеченные после эвтаназии животных, помещались в пробирку типа Eppendorf объёмом 2 мл.

ПЦР в реальном времени

Общую РНК экстрагировали из образцов лёгких с помощью набора «РНК-экстран» («Синтол», Россия) и переводили в ком-

Таблица. Олигонуклеотидные праймеры и зонды
Table. Oligonucleotide primers and PCR probes

Ген	Праймер/Зонд	Нуклеотидная последовательность
<i>SIRT1 mus</i>	F	5'- TCCTTGGAGACTGCGATGTT-3'
	R	5'- ATGAAGAGTGTTGGTGGCA-3'
	Z	ROX — TGAGTTGTGTCATAGGCTAGGTGGT-BHQ2
<i>SIRT2 mus</i>	F	5'- GGCTCAGGATTCAGACTCGG-3'
	R	5'- CTCCCACCAACAGATGACC-3'
	Z	ROX — GTGGAGAGGCAGAGATGGACTTCCT-BHQ2
<i>SIRT3 mus</i>	F	5'- TATGGGCTGATGTGATGGCG-3'
	R	5'- GAGGACTCAGAACGAACGGC-3'
	Z	ROX — TACTGGCGTTGTGAAACCCGACATT-BHQ2
<i>SIRT4 mus</i>	F	5'- GCACTCTGATGTCCAAAGGC-3'
	R	5'- TTACCAGAAGGCGCACACAGC-3'
	Z	ROX — CAATGCCGCTCCAACCTGTAATCCT-BHQ2
<i>SIRT5 mus</i>	F	5'- CGAACGCCAAGCACATAGCC-3'
	R	5'- GGTTGGGTTCTTTGCTCCGC-3'
	Z	ROX — CGCTGGAGGTTACTGGAGAAAATGG-BHQ2
<i>SIRT6 mus</i>	F	5'-TGGACTGGGAGGACTCGTTG-3
	R	5'- GTTGACAATGACCAGACGGC-3
	Z	ROX — CGGGACCTGATGCTCGCTGATGAGG-BHQ2
<i>SIRT7 mus</i>	F	5'- CAGGAGGAGGTGTGTGATGA-3
	R	5'- CTTAGGTCGGCAGCACTAC-3
	Z	ROX — AGGCACTGGTTGTCTACAGGGCG-BHQ2

плементарную ДНК с помощью набора «РЕВЕРТА-Л» («АмплиСенс», Россия) в соответствии с инструкциями производителей. Уровни транскрипции генов, кодирующих белки SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 и SIRT7, в исследуемых пробах определяли с помощью амплификатора CFX-96 («Bio-Rad», США) с использованием специфических праймеров и флуоресцентных зондов, указанных в табл.

В качестве референсного гена был выбран ген *GAPDH*. Результаты измерений представляли как кратное изменение уровней мРНК целевого гена через 30 мин после введения препаратов (n=6) относительно соответствующего значения у интактных животных.

Статистический анализ

Критерий Колмогорова—Смирнова применяли для выбора параметрических или непараметрических методов статистического

анализа. Статистический анализ проводили с помощью U-критерия Манна—Уитни с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.8.3.0 (США). Были использованы следующие обозначения: М — среднее, m — стандартная ошибка, n — объём выборки, p — достигнутый уровень значимости. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

ПЦР-анализ в реальном времени показывает, что транскриптом сиртуинов в легких интактных мышей представлен в основном двумя ядерными сиртуинами *SIRT1* и *SIRT6*, чьи абсолютные уровни мРНК на три-пять порядков превышают уровни мРНК остальных изоформ сиртуинов млекопитающих *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5* и *SIRT7* (рис. 1).

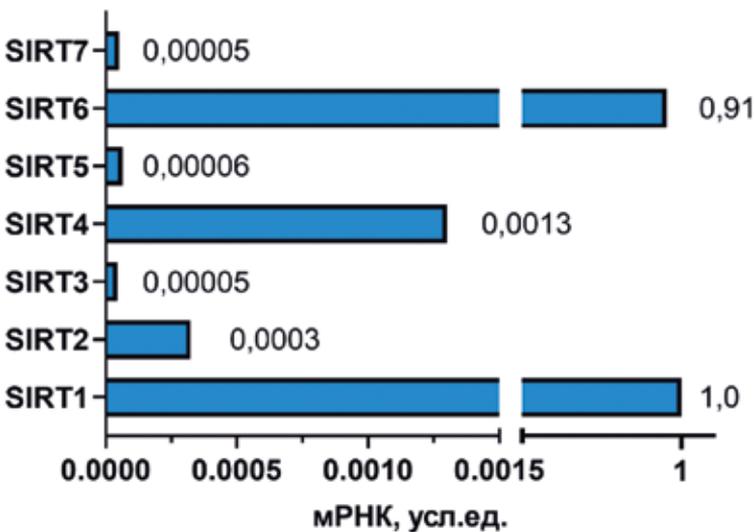


Рис. 1. Среднее содержание мРНК сиртуинов *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* и *SIRT7* в легких интактных мышей C57BL/6Y (n=3) по данным анализа ПЦР в реальном времени. Уровень мРНК *SIRT1* принят за 1,0.

Fig. 1. Mean mRNA levels of *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6*, and *SIRT7* sirtuins in the lungs of intact C57BL/6Y mice (n=3) according to real-time PCR. The mRNA level of *SIRT1* was set to 1.0.

Интра трахеальное введение липополисахарида ведет к повышению в легких уровней мРНК всех изоформ сиртуинов относительно уровней, наблюдаемых у интактных животных. Содержание мРНК основных ядерных сиртуинов *SIRT1* и *SIRT6* повышается в 3,7 и 1,7 раза, а уровни мРНК минорных сиртуинов *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*,

SIRT5 и *SIRT7* повышаются в 36, 40, 56, 3 и 1,7 раза соответственно. Ингаляционное введение Лейтрагина животным, индуцированным липополисахаридом, вызывает статистически значимое повышение в легких уровней мРНК *SIRT1* в 5,7 раза ($p < 0,01$; рис. 2Б), мРНК *SIRT2* — в 16 раз ($p < 0,01$; рис. 2В), мРНК *SIRT3* — в 23 раза ($p < 0,01$;

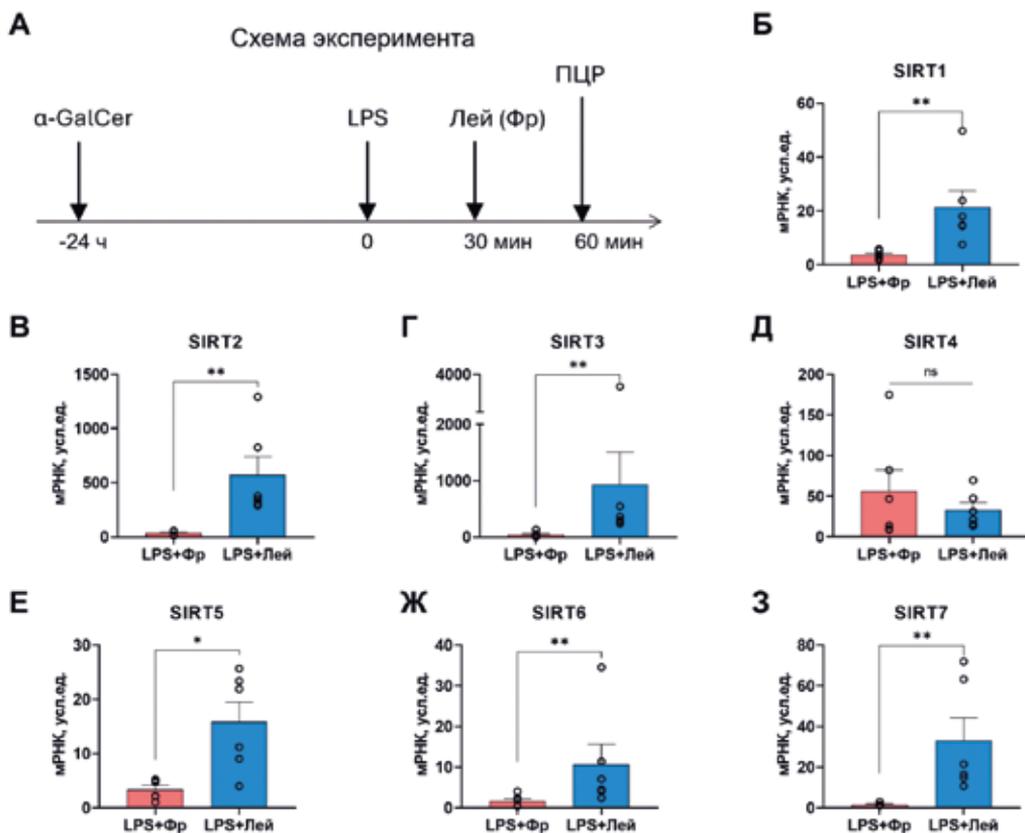


Рис. 2. Эффект Лейтрагина на транскрипцию сиртуинов в легких мышей C57BL/6Y (n=6) с острым воспалением легких, индуцированным липополисахаридом (LPS). Схема эксперимента (А). Уровни мРНК *SIRT1* (Б), *SIRT2* (В), *SIRT3* (Г), *SIRT4* (Д), *SIRT5* (Е), *SIRT6* (Ж) и *SIRT7* (З) в легких животных, индуцированных липополисахаридом и получавших ингаляционно Лейтрагин (LPS+Лей) или физ. р-р (LPS+Фр). M±m (n=6). ns — $p > 0,05$; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ по сравнению с контролем (LPS+Фр).

Fig. 2. Leitrugin effect on sirtuin transcription in the lungs of C57BL/6Y mice (n=6) with acute lung inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS). Experimental design (A). mRNA levels of *SIRT1* (B), *SIRT2* (B), *SIRT3* (Г), *SIRT4* (Д), *SIRT5* (Е), *SIRT6* (Ж), and *SIRT7* (З) in the lungs of animals induced with lipopolysaccharide and treated with inhaled Leitrugin (LPS+Лей) or saline (LPS+Фр). M±m (n=6). ns — $p > 0.05$; * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$ compared to the control (LPS+Фр).

рис. 2Г), мРНК *SIRT5* — в 4,7 раза ($p < 0,01$; рис. 2Е), мРНК *SIRT6* — в 6,4 раза ($p < 0,01$; рис. 2Ж) и мРНК *SIRT7* — в 19,9 раза ($p < 0,01$; рис. 2З) по сравнению с соответствующими уровнями мРНК у животных с острым воспалением легких, получавших ингаляционно физ. р-р. При этом Лейтрагин не имел статистически значимого влияния на транскрипцию *SIRT4* ($p = 0,937$; рис. 2Д) в легких по сравнению с контролем.

Обсуждение результатов

В настоящей работе впервые показано, что агонист δ -опиоидных рецепторов Лейтрагин при ингаляционном введении повышает транскрипцию сиртуинов 2, 3, 5, 6 и 7 в легких в условиях острого воспаления легких и ОРДС в дополнение к обнаруженному нами ранее положительному эффекту Лейтрагина на транскрипцию *SIRT1* [1, 2, 9].

Транскриптом сиртуинов в легких мышей C57BL/6Y представлен главным образом двумя ядерными сиртуинами *SIRT1* и *SIRT6*. Содержание мРНК остальных пяти сиртуинов, определенное методом ПЦР в реальном времени у здоровых интактных животных, было на три-пять порядков ниже, чем содержание мРНК *SIRT1* и *SIRT6*. Индукция воспаления легких липополисахаридом *E. coli* вызывает повышение транскрипции всех исследованных сиртуинов, но и в этих условиях среди всех изоформ сиртуинов по-прежнему преобладают мРНК *SIRT1* и *SIRT6*, составляя в сумме более 99% от всего транскриптома сиртуинов в воспаленных легких.

Ингаляционное введение Лейтрагина мышам с индуцированным липополисахаридом острым воспалением легких ведет к статистически значимому повышению уровней мРНК *SIRT1* и *SIRT6* в легких ($p < 0,01$) по сравнению с уровнями, достигаемыми у контрольных животных при ингаляционном введении физ. р-ра. Этот результат позволяет уточнить механизм противо-

спалительного действия Лейтрагина при ингаляционном введении. Согласно полученным в настоящей работе данным эффект Лейтрагина связан не только с активацией транскрипции *SIRT1*, но еще и с активацией транскрипции *SIRT6*, который также обладает противовоспалительными свойствами.

Известно, что противовоспалительный эффект *SIRT1* связан с его деацетилазной активностью. В частности, *SIRT1* деацетилирует транскрипционный фактор NF- κ B [16], снижая его транскрипционную активность [11]. *SIRT1* блокирует опосредуемую NF- κ B экспрессию провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α , деацетилируя гистоны H3K9 [17] и H4K16 [6] соответственно. Кроме того, *SIRT1* деацетилирует сайты ядерной локализации в составе HMGB1, что предотвращает транслокацию HMGB1 из ядра во внеклеточное пространство, предупреждая тем самым активацию провоспалительного сигнального пути HMGB1/TLR4/NF- κ B [8, 13]. Противовоспалительная активность *SIRT6* связана с его способностью деацетилировать гистон H3K9 и тем самым блокировать транскрипцию генов провоспалительных цитокинов, регулируемых транскрипционным фактором NF- κ B [10]. С указанными выше данными о характере противовоспалительной активности *SIRT1* и *SIRT6* полностью согласуются наблюдаемые противовоспалительные эффекты Лейтрагина [2, 3, 9]. Так, активация транскрипции *SIRT1* Лейтрагином ведет к снижению ацетилирования HMGB1 и снижению его внеклеточных концентраций в бронхолегочной жидкости в условиях воспаления [9]. Активация Лейтрагином транскрипции *SIRT1* и *SIRT6*, которые, как известно, блокируют действие NF- κ B [6, 8, 10, 11, 13, 16, 17], полностью согласуется с наблюдаемым снижением транскрипции провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1- β и IL-6 при ингаляционном введении Лейтрагина мышам с острым воспалением легких и ОРДС [2, 3].

Заключение

В настоящей работе впервые изучены эффекты Лейтрагина, пептидного агониста δ -опиоидных рецепторов, на транскрипцию всех известных семи изоформ сиртуинов млекопитающих в условиях острого воспаления легких. Впервые показано, что ингаляционное введение Лейтрагина статистически значимо повышает экспрессию мРНК *SIRT6* в легких животных с моделированным острым воспалением легких и ОРДС. Также впервые показано, что Лейтрагин статистически значимо повышает транскрипцию минорных сиртуинов 2, 3, 5 и 7 в легких в условиях острого воспаления, но этот эффект Лейтрагина не является основным, т.к. содержание мРНК указанных сиртуинов в общем транскриптом сиртуинов не превышает 1%.

Полученные в настоящей работе результаты позволяют уточнить механизм противовоспалительного действия Лейтрагина, который, согласно полученным новым

данным, определяется способностью Лейтрагина активировать транскрипцию ядерных сиртуинов 1 и 6 в условиях воспаления. Известный механизм противовоспалительного действия сиртуинов 1 и 6 связан с их способностью согласованно блокировать действие провоспалительного транскрипционного фактора NF- κ B путем деацетилирования самого фактора (эффект *SIRT1*) и гистонов (эффекты *SIRT1* и *SIRT6*). Дополнительно к этому *SIRT1* подавляет провоспалительный сигнальный путь HMGB1/TLR4/NF- κ B, препятствуя секреции HMGB1 во внеклеточное пространство в условиях воспаления.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты уточняют механизм противовоспалительного действия Лейтрагина, который заключается в повышении транскрипции сиртуинов 1 и 6, известных отрицательных регуляторов провоспалительных сигнальных путей, где транскрипционный фактор NF- κ B играет ключевую роль.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Гасанов М.Т., Нестеров М.С., Фокин Ю.В., Табожкова Л.А., Алимкина О.В., Хвостов Д.В. Лейтрагин повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома при профилактическом и лечебном режимах введения. *Биомедицина*. 2020;16(4):44–51. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V., Gasanov M.T., Nesterov M.S., Fokin Yu.V., Alimkina O.V., Hvostov D.V. Lejtragin povishayet vijivaemost zhivotnih v modeli fatalnogo ostrogo respiratornogo distress-sindroma pri profilacticheskom i lechebnom rezhimah vvedeniya [Leitragin increases animal survival in a model of fatal acute respiratory distress syndrome under prophylactic and therapeutic modes of administration]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):44–51. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-44-51.
2. Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Петрова Н.В., Нестеров М.С., Агельдинов Р.А., Зотова Л.В., Колоскова Е.М., Слободенюк В.В., Сковрцова В.И. Лейтрагин подавляет экспрессию цитокинов, включая интерлейкин-6, в модели «цитокинового шторма» у мышей линии C57BL/6Y с индуцированным острым респираторным дистресс-синдромом. *Биомедицина*. 2020;16(4):34–43. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Petrova N.V.,
- Nesterov M.S., Ageldinov R.A., Zotova L.V., Koloskova E.M., Slobodenyuk V.V., Skvortsova V.I. Lejtragin podavlyaet ekspressiyu citokinov, vlyuchaya interlejkin-6, v modeli «citokinovogo shtorma» u myshej linii C57BL/6Y s inducirovannym ostrym respiratornym distress-sindromom [Leitragin Inhibits Expression of Cytokines, Including Interleukin-6, in a “Cytokine Storm” Model in C57BL/6Y Mice with Induced Acute Respiratory Distress Syndrome]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):34–43. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-34-43.
3. Помыткин И.А., Огнева Н.С., Фокин Ю.В., Петрова Н.В., Алимкина О.В., Каркищенко В.Н. Эпигенетические механизмы противовоспалительного действия опиоидного пептида Лейтрагин: роль сиртуина 1. *Биомедицина*. 2024;20(3):10–20. [Pomytkin I.A., Ogneva N.S., Fokin Yu.V., Petrova N.V., Alimkina O.V., Karkischenko V.N. Epigeneticheskie mehanizmi protivovospalitel'nogo deistviya opioidnogo peptide Lejtragin: rol sirtuina 1. [Epigenetic mechanisms of the anti-inflammatory action of the opioid peptide Leitragin: role of sirtuin 1]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2024;20(3):10–20. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-20-3-10-20.
4. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследо-*

- ваниях. Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль-2С, 2010:358. [*Rukovodstvo po laboratornym zhitovnym i alternativnym modelyam v biomeditsinskih issledovaniyah [A Guide to Laboratory Animals and Alternative Models in Biomedical Research]*. Ed. by N.N. Karkischenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil'-2C Publ., 2010:358. (In Russian)].
5. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Ч. 1. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012:944. [*Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya [Guidelines for conducting pre-clinical studies of drugs. Part one]*. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012:944. (In Russian)].
 6. Chen G.D., Yu W.D., Chen X.P. Sirt1 activator represses the transcription of TNF- α in THP-1 cells of a sepsis model via deacetylation of H4K16. *Mol. Med. Rep.* 2016;14(6):5544–5550. DOI: 10.3892/mmr.2016.5942.
 7. Fu D., Liu H., Zhu J., Xu H., Yao J. [D-Ala2, D-Leu5] Enkephalin Inhibits TLR4/NF- κ B Signaling Pathway and Protects Rat Brains against Focal Ischemia-Reperfusion Injury. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:6661620. DOI: 10.1155/2021/6661620.
 8. Kang R., Chen R., Zhang Q., Hou W., Wu S., Cao L., Huang J., Yu Y., Fan X.G., Yan Z., Sun X., Wang H., Wang Q., Tsung A., Billiar T.R., Zeh H.J. 3rd, Lotze M.T., Tang D. HMGB1 in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 2014;40:1–116. DOI: 10.1016/j.mam.2014.05.001.
 9. Karkischenko V.N., Skvortsova V.I., Gasanov M.T., Fokin Y.V., Nesterov M.S., Petrova N.V., Alimkina O.V., Pomytkin I.A. Inhaled [D-Ala2]-Dynorphin 1-6 Prevents Hyperacetylation and Release of High Mobility Group Box 1 in a Mouse Model of Acute Lung Injury. *J. Immunol. Res.* 2021;2021:4414544. DOI: 10.1155/2021/4414544.
 10. Kawahara T.L., Michishita E., Adler A.S., Damian M., Berber E., Lin M., McCord R.A., Ongaigui K.C., Boxer L.D., Chang H.Y., Chua K.F. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell.* 2009;136(1):62–74. DOI: 10.1016/j.cell.2008.10.052.
 11. Kiernan R., Brès V., Ng R.W., Coudart M.P., El Messaoudi S., Sardet C., Jin D.Y., Emiliani S., Benkirane M. Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J. Biol. Chem.* 2003;278(4):2758–2766. DOI: 10.1074/jbc.M209572200.
 12. Morris B.J. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic. Biol. Med.* 2013;56:133–171. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.525.
 13. Rabadi M.M., Xavier S., Vasko R., Kaur K., Goligorsky M.S., Ratliff B.B. High-mobility group box 1 is a novel deacetylation target of Sirtuin1. *Kidney Int.* 2015;87(1):95–108. DOI: 10.1038/ki.2014.217.
 14. Tang C.W., Feng W.M., Du H.M., Bao Y., Zhu M. Delayed administration of D-Ala2-D-Leu5-enkephalin, a delta-opioid receptor agonist, improves survival in a rat model of sepsis. *Tohoku J. Exp. Med.* 2011;224(1):69–76. DOI: 10.1620/tjem.224.69.
 15. Yang Y., Liu Y., Wang Y., Chao Y., Zhang J., Jia Y., Tie J., Hu D. Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation. *Front. Immunol.* 2022;13:831168. DOI: 10.3389/fimmu.2022.831168.
 16. Yeung F., Hoberg J.E., Ramsey C.S., Keller M.D., Jones D.R., Frye R.A., Mayo M.W. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004;23(12):2369–2380. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600244.
 17. Zhang Y., Li Y., Li J., Li B., Chong Y., Zheng G., Sun S., Feng F. SIRT1 alleviates isoniazid-induced hepatocyte injury by reducing histone acetylation in the IL-6 promoter region. *Int. Immunopharmacol.* 2019;67:348–355. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.11.054.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

Петрова Наталья Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: m-sklad@yandex.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

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

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

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

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

Слободенюк Владимир Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: prof-v-iprim@mail.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

Леднева Надежда Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: kichi09@mail.ru

Nadezhda A. Ledneva, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: kichi09@mail.ru

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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ОПТИМИЗАЦИЯ ОЧИСТКИ АНТИГЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* МЕТОДОМ ДИАФИЛЬТРАЦИИ ОТ ГИДРОКСИЛАМИНА

Д.С. Мартынова, А.В. Солдатенкова*, А.А. Калошин, С.А. Лазарев,
О.М. Афанасьева, Н.А. Михайлова

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
105064, Российская Федерация, Москва, Малый Казенный пер., 5а

Распространенность и антибиотикорезистентность бактерий группы ESCAPE вызывает трудности в их профилактике и лечении. В лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» ведется разработка иммуностимулирующих препаратов для профилактики заболеваний, вызываемых некоторыми представителями этой группы, в т. ч. *Klebsiella pneumoniae*. При выделении протективного антигена в качестве инактивирующего агента в процессе производства препарата используется гидроксиламин, обладающий токсичными для организма человека свойствами. Очистку конечного продукта от него затрудняет полисахаридная капсула, выделяемая *K. pneumoniae*. Цель работы состояла в оценке эффективности используемых для диафильтрации различных отмывающих растворов и их влияния на специфическую активность и химический состав получаемых антигенных комплексов *K. pneumoniae*. В исследовании использовали штамм *K. pneumoniae* 204, выращенный глубинным культивированием. Клетки полученной культуры выделяли методом центрифугирования и инактивировали гидроксиламином. Удаление инактивирующего агента проводили методом ультрафильтрации в режиме диафильтрации с использованием воды или буферов Tris-HCl pH=9,0 различных концентраций. Полученные антигены оценивали по содержанию остаточного гидроксиламина, полисахаридов, белка методом Лоури, нуклеиновых кислот методом Спирина и специфической активности методом РТПГА. Получены образцы антигенсодержащей жидкости *K. pneumoniae* 204. При использовании в процессе удаления гидроксиламина буферов Tris-HCl pH=9,0 содержание гидроксиламина снижалось до допустимых значений (менее 1 мкг/мл) при использовании 25-кратного объема раствора в любой из исследованных концентраций. Тогда как при использовании дистиллированной воды в качестве очищающего раствора в тех же объемах добиться аналогичного результата не получалось. Проведен анализ химического состава полученных антигенных комплексов. Применение буферного раствора Tris-HCl pH=9,0 10 мМ для удаления гидроксиламина из антигенсодержащей жидкости *K. pneumoniae* оптимально и не влияет на химический состав и активность ее антигенных комплексов.

Ключевые слова: *K. pneumoniae*, культивирование, гидроксиламин, ультрафильтрация, диафильтрация

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: настоящая работа выполнена в рамках соглашения с Министерством промышленности и торговли РФ о предоставлении грантов в форме субсидий из федерального бюджета бюджетным учреждениям на реализацию проектов по разработке лекарственных препаратов и медицинских изделий № 020-15-2021-005 от 07.10.2021.

Для цитирования: Мартынова Д.С., Солдатенкова А.В., Калошин А.А., Лазарев С.А., Афанасьева О.М., Михайлова Н.А. Оптимизация очистки антигенных комплексов *Klebsiella pneumoniae* методом диафильтрации от гидроксиламина. *Биомедицина*. 2025;21(1):18–25. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-18-25>

Поступила 14.01.2025

Принята после доработки 25.02.2025

Опубликована 10.03.2025

EFFECT OF WASHING SOLUTIONS ON DIAFILTRATION EFFICIENCY AND PROPERTIES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ANTIGENIC COMPLEXES

Daria S. Martynova, Alena V. Soldatenkova*, Alexei A. Kaloshin, Sergey A. Lazarev, Olga M. Afanasyeva, Natalia A. Mikhailova

*Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow, Maliy Kazenniy Alleyway, 5a*

The prevalence and antibiotic resistance of ESKAPE bacteria cause difficulties in the prevention and treatment of their infections. Specialists of the Protective Antigen Laboratory of I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums continue work on developing immunostimulating drugs for the prevention of diseases caused by some representatives of this group, including *Klebsiella pneumoniae*. When producing a drug and isolating a protective antigen, hydroxylamine is used as an inactivating agent. Purification of the final product from this toxic substance is complicated by a polysaccharide capsule secreted by *K. pneumoniae*. In this work, we evaluate the diafiltration efficiency of various washing solutions and their effect on the specific activity and chemical composition of the resulting antigen complexes of *K. pneumoniae*. To that end, a submerged cultured strain of *K. pneumoniae* 204 was used. The cells of the resulting culture were isolated by centrifugation and inactivated with hydroxylamine. The inactivating agent was removed by ultrafiltration in diafiltration mode using water or Tris-HCl buffers (pH=9.0) of various concentrations. The as-obtained antigens were assessed in terms of the content of residual hydroxylamine, polysaccharides, protein by the Lowry method, nucleic acids by the Spirin method, and specific activity by hemagglutination inhibition assay. Samples of antigen-containing fluid of *K. pneumoniae* 204 were obtained. The use of Tris-HCl buffers (pH=9.0) for hydroxylamine removal led to a reduction in the hydroxylamine content to acceptable values (less than 1 µg/mL) when using a 25-fold volume of the solution in any of the studied concentrations. At the same time, the use of distilled water as a purifying solution in similar volumes did not produce a comparable result. The chemical composition of the resulting antigenic complexes was analyzed. The use of a Tris-HCl buffer solution (pH=9.0) at a concentration of 10 mM proves optimal for removing hydroxylamine from an antigen-containing fluid of *K. pneumoniae*, having no effect on the chemical composition and activity of its antigen complexes.

Keywords: *K. pneumoniae*, cultivation, hydroxylamine, ultrafiltration, diafiltration

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

Funding: The work was carried out within the framework of the agreement with the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation on the provision of grants in the form of subsidies from the Federal budget to budgetary institutions for the implementation of projects on the development of drugs and medical devices No. 020-15-2021-005 dated 10/07/2021.

For citation: Martynova D.S., Soldatenkova A.V., Kaloshin A.A., Lazarev S.A., Afanasyeva O.M., Mikhailova N.A. Effect of Washing Solutions on Diafiltration Efficiency and Properties of *Klebsiella pneumoniae* Antigenic Complexes. *Journal Biomed.* 2025;21(1):18–25. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-18-25>

Submitted 14.01.2025

Revised 25.02.2025

Published 10.03.2025

Введение

В течение последних десятилетий группа ESKAPE представляет серьезную проблему для здравоохранения. Данная группа состоит из бактерий, обладающих наиболее высокой резистентностью к широкому спектру коммерчески доступных антибиотиков и являющихся наиболее частыми возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП): *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.* В связи с экономическими и технологическими затруднениями темпы внедрения новых антибактериальных препаратов отстают от скорости формирования устойчивости штаммов данных бактерий к антибиотикам [11]. В связи с этим возникает необходимость разработки иммуностимулирующих препаратов для профилактики и лечения заболеваний, вызываемых ESKAPE-патогенами и в частности *K. pneumoniae*.

K. pneumoniae можно обнаружить практически во всех средах обитания, включая почву, сточные воды [8], поверхность растений [5, 7], организм человека [6] и животных [10, 15], а также на поверхности медицинского оборудования [12]. *K. pneumoniae* может передавать свои детерминанты множественной лекарственной устойчивости (MDR) другим видам бактерий [14]. Среди ее вирулентных факторов можно отметить фимбрии, благодаря которым бактериальная клетка адгезирует к тканям организма; белок наружной мембраны OmpA, предотвращающий активацию эпителиальных клеток дыхательных путей; белки наружной мембраны OmpK36, KpnO и OmpK26, отсутствие которых повышает резистентность бактерии к цефалоспорином и карбапенемам; обильная капсула из полисахаридов, которая защищает клетки от опсонизации и фагоцитоза и ингибирует Toll-подобные рецепторы TLR2 и TLR4, что, в свою очередь, затормаживает

экспрессию интерлейкина 8 и подавляет воспалительный процесс [9].

В лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» ведется разработка технологии производства лекарственного средства для профилактики бактериальных и вирусных инфекций на основе антигенов условно-патогенных бактерий, стимулирующих врожденный иммунитет. В его состав входят антигенные комплексы *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. vulgaris* и *S. aureus*.

Технология получения антигенного комплекса *K. pneumoniae* включает выделение растворимых антигенов из инактивированных гидроксиламином бактериальных клеток. Поскольку инактивирующий агент обладает токсическими свойствами, то для его удаления проводят диализ либо ультрафильтрацию в режиме диафильтрации. Однако капсула из полисахаридов и вязкая слизь (hypermucoviscosity) *K. pneumoniae* [13] затрудняют удаление гидроксилана до допустимых в лекарственных средствах значений (т.е. менее 1 мкг/мл). По нашему предположению, слизистая капсульная оболочка закупоривает поры фильтра при ультрафильтрации, что осложняет очистку антигенсодержащей жидкости от гидроксилана. Для решения этой проблемы необходимо оптимизировать режим ультрафильтрации антигенсодержащей жидкости и подобрать наиболее эффективный отмывающий раствор.

Цель работы — оценить эффективность используемых для диафильтрации различных отмывающих растворов и их влияния на специфическую активность и химический состав получаемых антигенных комплексов *K. pneumoniae*.

Материалы и методы

Использованные бактериальные штаммы

В исследовании использовали штаммы *K. pneumoniae* 204 из уникальной науч-

ной установки «коллекция микроорганизмов III–IV групп патогенности НИИВС им. И.И. Мечникова».

Глубинное культивирование *K. pneumoniae*

Культуру *K. pneumoniae* из ампул высевали в пробирки с жидкой питательной средой и инкубировали в течение 4 ч в термостате при температуре 37°C. Далее культуру первого пассажа пересевали на марты со стерильным питательным агаром и выращивали в течение 18±2 ч в термостате при температуре 37°C. После смыва с питательной среды стерильным физ. р-ром клетки суспендировали и засевали в ферментер ФА 10 («Проинтех», Россия) в среду, состав которой был предварительно подобран экспериментально. В процессе культивирования контролировали температуру, рН, аэрацию и концентрацию микробных клеток.

Получение антигенсодержащей жидкости

Биомассу после культивирования извлекали от культуральной жидкости центрифугированием при температуре 5±1°C и ускорении 17800 g. Осадок разводили в дистиллированной воде до 20×10⁹ КОЕ/мл, контролируя концентрацию в соответствии с ОФС.1.7.2.0008.15 «Определение концентрации клеток микроорганизмов» визуальным методом [2]. Полученную суспензию инактивировали гидроксилaminом в концентрации 1 г/л в течение 60±2 ч при температуре 48±1°C. Из полученной суспензии методом центрифугирования или микрофильтрации удаляли обломки разрушенных микробных клеток.

Получение антигенных комплексов *K. pneumoniae*

Удаление гидроксилamina из антигенсодержащей жидкости проводили методом ультрафильтрации в режиме диафильтрации на установке FF-holder Cobetter (“Cobetter”, Китай) с гидрофильными полиэфирсульфоновыми кассетами UFELA0010010P,

имеющими предел отсечения 10 кДа (“Cobetter”, Китай).

Вначале проводили концентрирование антигенсодержащей жидкости до 1 л. Затем доводили объем концентрата до 10 л отмывающим р-ром и также осуществляли концентрирование до 1 л, повторяя процедуру шесть раз. В одном случае на всех стадиях диафильтрации в качестве отмывающего р-ра использовали только дистиллированную воду, в другом случае на первых трех стадиях использовали буферные р-ры Tris-HCl pH=9,0 с различной концентрацией (10; 12,5; 25 и 50 мМ).

Полученные препараты антигенных комплексов высушивали методом лиофилизации.

Оценка химического состава антигенных комплексов

Содержание остаточного гидроксилamina определяли согласно МУК 4.1/4.2.588–96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям» [1]. Содержание остаточного гидроксилamina рассчитывали с помощью линейного калибровочного графика в диапазоне концентраций солянокислого гидроксилamina (“SRL”, Индия) от 0,2 до 10 мкг/мл с шагом 0,2 мкг/мл.

Определение содержания общего белка выполняли методом Лоури. Реактив А (2 г Na₂CO₃ («Ленреактив», Россия) в 100 мл 0,1 М NaOH («Диаэм», Россия) смешивали с реактивом Б (1,26 г CuSO₄·5H₂O («Химмед», Россия) в 250 мл 1% раствора Na₃C₆H₅O₇·5,5H₂O («Химмед», Россия) в соотношении 49:1 и добавляли к 400 мкл образцов в объеме 2 мл, через 10 мин после перемешивания добавляли реактив Фолина (“Panreac Applichem”, Испания), разбавленный в дистиллированной воде 1:1, и, перемешав, оставляли в темном месте на 45 мин при комнатной температуре. Для построения линейного калибровочного графика использовали р-р бычьего сывороточного альбумина (БСА) (“Sigma-Aldrich”,

США) с концентрациями 20, 40, 80, 100, 160 и 200 мкг/мл. Определяли оптическую плотность при длине волны 750 нм в кювете с толщиной стенки 10 мм с дистиллированной водой в качестве раствора сравнения.

Содержание сахаров определяли согласно ОФС.1.2.3.0019.15 «Определение сахаров спектрофотометрическим методом» пункт 1.1 «Метод определения с антроновым реактивом» [4]. Для построения калибровочного графика использовали р-р глюкозы («Лаверна», Россия) в концентрации 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 и 0,1 мг/мл.

Содержание нуклеиновых кислот определяли согласно ОФС.1.7.2.0018.15 «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в биологических лекарственных препаратах» [3].

Определение специфической активности антигенных комплексов

Специфическую активность полученного клесиллезного антигена определяли методом реакции торможения пассивной гемагглютинации (РТПГА) с использованием эритроцитарного диагностикума клесилеллы пневмонии («ООО Био-Диагностика», Россия).

Для проведения реакции в лунки 96-луночного планшета для иммунологических реакций вносили разбавленный р-р исследуемого антигена *K. pneumoniae* в концентрации 0,01 мг/мл в объеме 50 мкл и делали последовательные двукратные разведения в физ. р-ре. Затем в лунки планшета добавляли 50 мкл 2 ГАЕ, содержащей антитела к *K. pneumoniae* сыворотки, титр которой определяли заранее методом реакции прямой гемагглютинации (РПГА). Перемешивали содержимое лунок путем встряхивания и помещали в термостат с температурой $37\pm 1^\circ\text{C}$ на 25 ± 5 мин, а затем прибавляли по 25 мкл диагностикума. Учет результатов проводили по четырехкрестной системе. Отсчет минимальной тормозящей дозы (МТД) проводили с первой лунки ряда. Абсолютное количество

антигенного комплекса в первой лунке составляло 5 мкг. За 1 МТД принимали наименьшее количество антигена в мкг, при котором отмечали торможение РПГА не более чем на один крест.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel 2016, используя для построения калибровочных графиков линейную регрессию.

Количественные данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1; Q3). Для сравнения более двух независимых групп применяли непараметрический критерий Краскела—Уоллиса. При вычислении post-hoc теста использовали критерий Манна—Уитни. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты и их обсуждение

Проведена серия культивирований *K. pneumoniae* 204 в ферментере, в результате получены 17 образцов антигенсодержащей жидкости *K. pneumoniae* 204. Из них три образца очищены с использованием дистиллированной воды в качестве отмывающего р-ра для диафильтрации, три образца — с использованием 50 мМ, три — с 25 мМ, три — 12,5 мМ и пять — с использованием 10 мМ Tris-HCl pH=9,0. Измеряли содержание остаточного гидроксилamina после каждой стадии очистки (табл. 1). У всех вариантов, очищенных с помощью буферных р-ров на основе Tris-HCl pH=9,0, содержание гидроксилamina снизилось до допустимых значений (менее 1 мкг/мл) на пятом цикле, в то время как у образцов, очищенных с помощью дистиллированной воды, не удалось провести эффективный процесс диафильтрации. Даже после шестого цикла очистки с дистиллированной водой содержание гидроксилamina составляло более 10 мкг/мл во всех трех образцах, поэтому эти образцы не использовали в последующих исследованиях химического состава антигенных комплексов.

Таблица 1. Содержание остаточного гидроксилamina в образцах антигенов в процессе ультрафильтрации, мкг/мл
Table 1. Content of residual hydroxylamine in antigen samples during the ultrafiltration process, µg/mL

Отмывающий раствор	Дистиллированная вода (n=3)	Tris-HCl pH 9,0				
		50 mM (n=3)	25 mM (n=3)	12,5 mM (n=3)	10,0 mM (n=5)	
№ стадии ультрафильтрации	1	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
	2	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
	3	>10,0	6,4±4,2	6,8±3,9	5,4±3,3	4,2±0,8
	4	>10,0	1,95±1,7	1,1±0,1	1,5±0,1	1,1±0,2
	5	>10,0	0,63±0,26	0,87±0,17	0,66±0,2	0,56±0,28
	6	>10,0	0,4±0,22	0,31±0,17	0,32±0,2	0,4±0,19

Для анализа химического состава (общий белок, содержание полисахаридов и нуклеотидов) и специфической активности методом РТПГА образцы антигенных комплексов лиофилизировали и растворяли в дистиллированной воде до концентрации 1 мг/мл. Минимальная тормозящая доза полученных антигенов в РТПГА соответствовала нормативным значениям для всех полученных вариантов и составляла от 0,01 до 0,04 мкг (табл. 2).

Содержание общего белка в образцах антигена штамма *K. pneumoniae* 204 составило от 30,79 до 41,99 мкг, полисахаридов — от 0,48 до 0,65 мг, нуклеиновых кислот — от 9,76 до 11,71 мкг на 1 мг антигена.

Статистически значимых различий в химическом составе между образцами, полученными с использованием буферных р-ров Tris-HCl pH=9,0 различной концентрации, не обнаружено (табл. 2). В связи с этим для эффективной очистки антигенсодержащей жидкости *K. pneumoniae* выбран буферный р-р Tris-HCl pH=9,0 с наименьшей концентрацией (10 mM).

Заключение

В результате проведенных исследований показано, что применение для диафильтрации антигенсодержащей жидкости *K. pneumoniae* дистиллированной воды в качестве отмывающего р-ра не обеспечивает

Таблица 2. Результаты оценки химического состава и специфической активности антигенных комплексов *K. pneumoniae* 204

Table 2. Chemical composition and specific activity of antigen complexes of *K. pneumoniae* 204

Концентрация Tris-HCl, mM	Общий белок (мкг в 1 мг АГ) Me (Q1;Q3)	Полисахариды (мг в 1 мг АГ) Me (Q1;Q3)	Нуклеиновые кислоты (мкг в 1 мг АГ) Me (Q1;Q3)	Специфическая активность (РТПГА, мкг) Me (Q1;Q3)
50	30,79 (27,21; 35,38)	0,52 (0,38; 0,66)	9,92 (9,43; 10,25)	0,04 (0,04; 0,59)
25	36,08 (34,57; 38,09)	0,48 (0,39; 0,49)	9,76 (7,64; 11,06)	0,04 (0,04; 0,04)
12,5	41,71 (37,20; 48,01)	0,65 (0,52; 0,66)	11,47 (11,10; 11,95)	0,04 (0,04; 0,04)
10	41,99 (33,01; 48,26)	0,46 (0,42; 0,50)	11,71 (11,06; 13,01)	0,01 (0,01; 0,01)
p-value	1–2=0,11 1–3=0,02* 1–4=0,04* 2–3=0,02* 2–4=0,2 3–4=0,5	1–2=0,81 1–3=0,91 1–4=0,50 2–3=0,65 2–4=0,59 3–4=0,25	1–2=0,54 1–3=0,01* 1–4<0,01* 2–3=0,65 2–4<0,01* 3–4=0,67	–

Примечания (здесь): * — статистически значимые различия ($p<0,05$); АГ — антиген; РТПГА — реакция торможения пассивной гемагглютинации.

Notes (here): * — statistically significant differences ($p<0.05$); АГ — antigen; РТПГА — hemagglutination inhibition assay.

снижение содержания гидроксилами- на до допустимых значений (менее 1 мкг/мл) в получаемом антигенном комплексе. Буферные р-ры на основе Tris-HCl pH=9,0 с различной концентрацией позволяют эффективно очистить антигенный комплекс от гидроксилamina. Все исследованные концентрации Tris-HCl (50; 25; 12,5 и 10 мМ) снижают уровень гидроксилamina с одинаковой эффективностью. Статистически значимого различия в содержании полисахаридов и нуклеиновых кислот между антигенами, полученными при очистке буферами Tris-HCl pH=9,0, не обнаружено. При уменьшении концен-

трации Tris-HCl в буфере наблюдается увеличение содержания белков в полученных образцах. Однако специфическая активность антигенных комплексов штамма *K. pneumonia* 204 остается в пределах нормативных значений независимо от содержания белка. Следовательно, в технологии получения антигенного комплекса оптимально использовать р-р Tris-HCl pH=9,0 в концентрации 10 мМ.

Таким образом, для оптимизации очистки антигенных комплексов *K. pneumoniae* от гидроксилamina при применении метода диафильтрации эффективно использование буферного р-ра на основе Tris-HCl pH=9,0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. МУК 4.1/4.2.588-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям». [МУК 4.1/4.2.588-96 «Metody kontrolya medicinskih immunobiologicheskikh preparatov, vvodimyyh lyudyam» [Guidelines 4.1/4.2.588-96 “Methods for control of medical immunobiological preparations administered to humans”]. (In Russian)].
2. ОФС.1.7.2.0008.15 «Определение концентрации клеток микроорганизмов». [ОФС.1.7.2.0008.15 «Opredelenie koncentracii kletok mikroorganizmov» [General Pharmacopoeia Article 1.7.2.0008.15 “Determination of the concentration of microorganism cells”]. (In Russian)].
3. ОФС.1.7.2.0018.15 «Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в биологических лекарственных препаратах». [ОФС.1.7.2.0018.15 «Opredelenie nukleinovyyh kislot po metodu Spirina v biologicheskikh lekarstvennykh preparatah» [General Pharmacopoeia Article 1.7.2.0018.15 Determination of Nucleic Acids by Spirin's Method in Biological Medicinal Products]. (In Russian)].
4. ОФС.1.2.3.0019.15 «Определение сахаров спектрофотометрическим методом». [ОФС.1.2.3.0019.15 «Opredelenie saharov spektrofotometricheskim metodom» [General Pharmacopoeia Article 1.2.3.0019.15 Determination of Sugars by Spectrophotometric Method]. (In Russian)].
5. Cakmakci M.L., Evans H.J., Seidler R.J. Characteristics of nitrogen-fixing *Klebsiella oxytoca* isolated from wheat roots. *Plant soil*. 1981;61(1):53–63. DOI: 10.1007/BF02277362.
6. Gorrie C.L., Mirceta M., Wick R.R., Edwards D.J., Thomson N.R., Strugnell R.A., et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin. Infect. Dis*. 2017;65(2):208–215.
7. Huang M., Lin L., Wu Y., Honhing H., He P., Li G., He P., et al. Pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* (KpC4) infecting maize and mice. *J. Integr. Agric*. 2016;15(7):1510–1520. DOI: 10.1016/S2095-3119(16)61334-5.
8. Kumar P., Dash B., Suyal D.C., Gupta S.B., Singh A.K., Chowdhury T., et al. Characterization of Arsenic-Resistant *Klebsiella pneumoniae* RnASA11 from Contaminated Soil and Water Samples and Its Bioremediation Potential. *Curr. Microbiol*. 2021;78(8):3258–3267. DOI: 10.1007/s00284-021-02602-w.
9. Li B., Zhao Y., Liu C., Chen Z., Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol*. 2014;9(9):1071–1081. DOI: 10.2217/fmb.14.48.
10. Marques C., Menezes J., Belas A., Aboim C., Cavaco-Silva P., Trigueiro G., et al. *Klebsiella pneumoniae* causing urinary tract infections in companion animals and humans: population structure, antimicrobial resistance and virulence genes. *J. Antimicrob. Chemother*. 2019;74(3):594–602. DOI: 10.1093/jac/dky499.
11. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 2013;11(3):297–308. DOI: 10.1586/eri.13.12.
12. Pereira S.G., Alarico S., Tiago I., Reis D., Nunes-Costa D., Cardoso O., et al. Studies of antimicrobial resistance in rare mycobacteria from a nosocomial environment. *BMC Microbiol*. 2019;19(1):62. DOI: 10.1186/s12866-019-1428-4.
13. Rendueles O. Deciphering the role of the capsule of *Klebsiella pneumoniae* during pathogenesis: A cautionary tale. *Mol. Microbiol*. 2020;113(5):883–888. DOI: 10.1111/mmi.14474.
14. Wyres K.L., Holt K.E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental

to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018;45:131–139. DOI: 10.1016/j.mib.2018.04.004.
15. Zadoks R.N., Griffiths H.M., Munoz M.A., Ahlstrom C., Bennett G.J., Thomas E., et al. Sources of *Klebsiella*

and *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk. *J. Dairy Sci.* 2011;94(2):1045–1051. DOI: 10.3168/jds.2010-3603.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мартынова Дарья Сергеевна, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»;
e-mail: martynova_d_s@mail.ru

Daria S. Martynova, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera;
e-mail: martynova_d_s@mail.ru

Солдатенкова Алена Владимировна*, к.б.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»;
e-mail: sol.alena.v@yandex.ru

Alena V. Soldatenkova*, Cand. Sci. (Biol.), Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera;
e-mail: sol.alena.v@yandex.ru

Калошин Алексей Алексеевич, к.б.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»;
e-mail: alex-k-1973@yandex.ru

Alexei A. Kaloshin, Cand. Sci. (Biol.), Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera;
e-mail: alex-k-1973@yandex.ru

Лазарев Сергей Александрович, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»;
e-mail: lazarevsr1@gmail.com

Sergey A. Lazarev, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera;
e-mail: lazarevsr1@gmail.com

Афанасьева Ольга Юрьевна, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»;
e-mail: kukina1994@mail.ru

Olga M. Afanasyeva, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera;
e-mail: kukina1994@mail.ru

Михайлова Наталья Александровна, д.м.н., проф., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»;
e-mail: n_mikhailova@inbox.ru

Natalia A. Mikhailova, Dr. Sci. (Med.), Prof., Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera;
e-mail: n_mikhailova@inbox.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



РАЗРАБОТКА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СТАБИЛИЗАТОРОВ УГЛЕВОДНОЙ ПРИРОДЫ МЕТОДОМ ИОНООБМЕННОЙ ВЭЖХ

А.С. Минеро*, О.Б. Рунова, О.В. Фадейкина, Р.А. Волкова, О.Б. Устинникова

*ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России
127051, Российская Федерация, Москва, Петровский б-р, 8, стр. 2*

Количественное определение вспомогательных веществ является фармакопейным требованием оценки качества биологических лекарственных препаратов. Для определения стабилизаторов углеводной природы (сорбитол, маннитол, трегалоза, глюкоза, лактоза, сахароза и мальтоза) ранее в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России была разработана методика ионообменной ВЭЖХ с импульсным амперометрическим детектированием. Для рутинного воспроизведения методики необходим стандартный образец внутрилабораторного контроля анализа, т. к. проверка пригодности хроматографической системы является обязательной процедурой для всех хроматографических методик контроля качества фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Кроме того, использование единых стандартных образцов позволяет сопоставимые результаты испытаний в разных лабораториях. В результате проведенных исследований разработаны состав и форма выпуска стандартного образца контроля стабильности определения стабилизаторов углеводной природы. Присвоена аттестованная характеристика — диапазон значений фактора разрешения между парами пиков сорбитол/маннитол и маннитол/трегалоза 1,8–2,4 и 2,1–2,9 соответственно. Другим парам пиков (трегалоза/глюкоза, глюкоза/лактоза, лактоза/сахароза и сахароза/мальтоза) присвоена полуколичественная аттестованная характеристика — фактор разрешения не менее 3,0.

Ключевые слова: стандартный образец, анионообменная ВЭЖХ, стабилизаторы углеводной природы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

Для цитирования: Минеро А.С., Рунова О.Б., Фадейкина О.В., Волкова Р.А., Устинникова О.Б. Разработка стандартного образца для количественной оценки стабилизаторов углеводной природы методом ионообменной ВЭЖХ. *Биомедицина*. 2025;21(1):26–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-26-33>

Поступила 16.09.2024

Принята после доработки 13.01.2025

Опубликована 10.03.2025

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL FOR QUANTITATIVE EVALUATION OF CARBOHYDRATE STABILIZERS BY ION EXCHANGE HPLC

**Anastasia S. Minero*, Olga B. Rounova, Olga V. Fadeikina,
Rauza A. Volkova, Olga B. Ustinnikova**

*Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia
127051, Russian Federation, Moscow, Petrovsky Boulevard, 8, Build. 2*

Quantitative determination of excipients is a pharmacopoeial requirement for assessing the quality of biological medicinal products. For determination of carbohydrate stabilizers (sorbitol, mannitol, trehalose, glucose, lactose, sucrose, and maltose), the Scientific Center for Expert Evaluation of Medical Products of the Ministry of Health of the Russian Federations prescribes the method of anionic exchange HPLC with pulse amperometric detection. Routine application of this method requires a reference material of intralaboratory analytical control, since the suitability of chromatographic systems must be checked prior to use of all chromatographic methods for quality control of pharmaceutical substances and medicinal products. In addition, certified reference materials permit interlaboratory comparison of test results. In this study, we set out to develop the composition and a release form of a certified reference material for stability control of determination of carbohydrate stabilizers. The range of the resolution factor between the peak pairs of sorbitol/mannitol and mannitol/trehalose was used as a certified characteristic, being 1.8–2.4 and 2.1–2.9, respectively. For other peak pairs (trehalose/glucose, glucose/lactose, lactose/sucrose, and sucrose/maltose), a semi-quantitative certified characteristic was assigned, i.e., a resolution factor of at least 3.0.

Keywords: certified reference material, anionic exchange HPLC, stabilizer carbohydrate nature

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

Funding: The study was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00026-24-01 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 124022200103-5).

For citation: Minero A.S., Rounova O.B., Fadeikina O.V., Volkova R.A., Ustinnikova O.B. Certified Reference Material for Quantitative Evaluation of Carbohydrate Stabilizers by Ion Exchange HPLC. *Journal Biomed.* 2025;21(1):26–33. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-26-33>

Submitted 16.09.2024

Revised 13.01.2025

Published 10.03.2025

Введение

К биологическим лекарственным препаратам (далее — БЛП) в соответствии с терминологией Государственной Фармакопеи РФ, фармакопеи Евразийского экономического союза (ЕАЭС), Европейской фармакопеи (ЕФ), а также управления по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) относят вакцины, кровь и ее компоненты, аллергены, соматические клетки, препараты генной терапии, ткани и рекомбинантные терапевтические белки. К перечисленным группам лекарственных средств относятся препараты, которые в соответствии с распоряжением Правительства РФ от 12.10.2019 № 2406-р (ред. от 16.04.2024) входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов.

Ряд таких препаратов в качестве стабилизаторов содержат вещества углеводной природы, например ферментные препараты («Глуразим», «Церезим»), факторы свер-

тывания крови («Октофактор», «Адвейт», «Нувик», «Энплеит» и т. д.), препараты рекомбинантных моноклональных антител («Дупиксент»), соматропины, иммуноглобулины нормальные человеческие и специфические иммуноглобулины, вакцины в соответствии с национальным календарем профилактических прививок и календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям, а также вакцины для профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19. Данные вещества вносят в состав готового препарата с целью придания определенных физико-химических и биофармацевтических свойств, а также для обеспечения контролируемой или пролонгированной доставки лекарств [5, 11, 12].

Анализ состава БЛП, зарегистрированных в РФ, показал, что самыми распространенными вспомогательными веществами углеводной природы являются маннитол и сахароза, примерно в 3 раза реже используются

сорбитол, трегалоза, лактоза, мальтоза и глюкоза. Кроме того, в состав некоторых БЛП перечисленные углеводы входят в различных комбинациях друг с другом [8].

Одним из обязательных показателей оценки качества лекарственных препаратов является количественное определение вспомогательных веществ. Для определения содержания стабилизаторов углеводной природы (сорбитол, маннитол, трегалоза, глюкоза, лактоза, сахароза и мальтоза) ранее в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России была разработана методика ионообменной ВЭЖХ с импульсным амперометрическим детектированием [2, 3]. Проверка пригодности хроматографической системы является обязательной процедурой для всех хроматографических методик контроля качества фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов [9, 10]. Целью тестирования пригодности системы является подтверждение стабильной работы хроматографической системы, обеспечивающей получение приемлемых результатов оценки качества лекарственного препарата. Для этого проверяют такие параметры, как фактор симметрии пиков, эффективность колонки, фактор разрешения для критических пар пиков, относительные стандартные отклонения площадей и времен удерживания пиков и др. параметры с использованием стандартного образца. Таким образом, разработка соответствующего стандартного образца является актуальной.

Цель работы — разработать стандартный образец для оценки разрешающей способности хроматографической системы при определении стабилизаторов углеводной природы методом анионообменной ВЭЖХ в биологических лекарственных препаратах.

Материалы и методы

В процессе разработки и аттестации кандидата в стандартный образец (СО) исполь-

зовали воду очищенную и деионизованную с помощью системы Mili Q, Millipore, реактивы фирмы Sigma Aldrich (сорбитол ($\geq 98\%$), маннитол ($\geq 98\%$), трегалоза дигидрат ($\geq 99\%$), глюкоза ($\geq 98\%$), лактоза ($\geq 98\%$), сахароза ($\geq 99,5\%$), мальтоза ($\geq 95\%$), азид натрия и раствор натрия гидроксида в воде 50% для ионной хроматографии).

Хроматографическое определение осуществляли на ионных хроматографах Dionex ICS 5000+ и Dionex ICS 6000+ с импульсным амперометрическим детектированием. Разделение осуществляли в изократическом режиме, на хроматографической колонке CarboPac PA1 размером 4×250 мм, с предколонкой CarboPac PA1 размером 4×50 мм. В исследовании использовали колонки и предколонки двух серий. Состав подвижной фазы — 160 мМ р-р натрия гидроксида, объем инъекции — 10 мкл, скорость потока подвижной фазы — 1 мл/мин, температура хроматографической колонки — 20°C [2, 3]. Полученные хроматограммы обрабатывали с помощью программного обеспечения Chromeleon.

Результаты исследований

Разработка кандидата в СО, оценка стабильности, обоснование выбора аттестованной характеристики

Состав (количество и концентрацию стабилизаторов, растворитель, консервант) и объем розлива кандидата в СО определяли исходя из области применения методики анионообменной ВЭЖХ (от 1 до 50 мкг/мл) [2, 3]. В состав вошли два полиола (сорбитол и маннитол), моносахарид (глюкоза) и четыре дисахарида (трегалоза, лактоза, сахароза и мальтоза). Исходные растворы готовили гравиметрически так, чтобы конечная концентрация каждого компонента в составе смеси составляла около 25 мкг/мл. В качестве растворителя использовали деионизованную воду. В качестве консерванта использовали азид натрия в концентрации 0,05%. Перед розливом в ампулы раствор

Таблица 1. Параметры пиков на хроматограммах кандидата в СО в течение 14 мес. (n=7)

Table 1. Peak parameters in the chromatograms of CRM candidate over 14 months (n=7)

Компонент	Фактор разрешения между пиками (X _{cp} /RSD, %)	Фактор симметрии (X _{cp} /RSD, %)	Эффективность колонки (X _{cp} /RSD, %)	Соотношение площадей пиков (X _{cp} /RSD, %)	Соотношение высот пиков (X _{cp} /RSD, %)
Сорбитол	2,2/5,0	1,57/12,0	6547/10,8	1,06/3,4	1,11/5,6
Маннитол	2,6/5,4	1,39/10,9	6365/11,1	0,97/1,8	1,03/3,2
Трегалоза	6,0/5,2	1,13/6,8	5516/7,0	0,94/3,2	0,98/1,0
Глюкоза	10,4/5,9	1,13/5,0	6528/11,2	1,00/2,4	0,99/1,9
Лактоза	4,2/7,1	1,11/4,9	5185/10,1	1,00/2,0	0,99/1,5
Сахароза	11,0/7,6	1,04/2,4	5233/13,4	1,00/2,4	1,00/2,1
Мальтоза	–	1,02/1,9	5149/15,3	0,99/2,0	1,00/2,1

фильтровали через мембранный фильтр из полиэфирсульфона с размером пор 0,2 мкм.

Раствор хранили в месте, защищенном от солнечного света, при температуре 2–8°C. Стабильность раствора оценивали методом естественного старения в реальном времени по результатам экспериментальных исследований (n=7), проведенных в течение 14 мес. Типичная хроматограмма р-ра кандидата в СО представлена на рисунке.

Как показано на рисунке, на хроматограмме водного р-ра консерванта отсутствуют пики со временем удерживания пиков компонентов кандидата в СО.

В качестве контролируемых параметров для каждого компонента установили фактор разрешения между пиками, фактор симметрии, эффективность (число теоретических тарелок), а также соотношение площадей и высот соответствующих пиков свежеприготовленного раствора и кандидата в СО (табл. 1).

Как показано в табл. 1, значения фактора разрешения, полученные для каждого пика на хроматограммах кандидата в СО, составили более 2, эффективность хроматографической колонки для каждого пика — более 5500, фактор симметрии не более 1,6. Полученные результаты соответствуют рекомендуемым требованиям

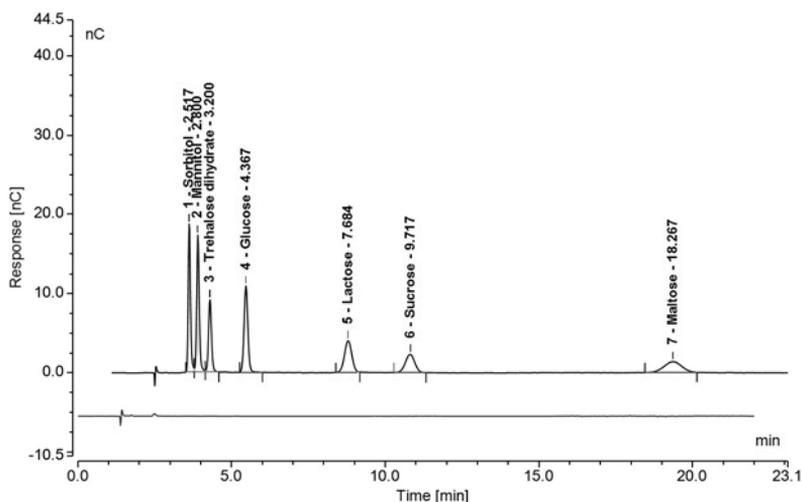


Рис. Типичная хроматограмма кандидата в СО (черная) и водного р-ра натрия азиды 0,05% (синяя).
Fig. Typical chromatogram of CRM candidate (black) and 0.05% aqueous sodium azide solution (blue).

Таблица 2. Оценка стабильности кандидата в СО по времени удерживания пиков каждого компонента (n=7)
Table 2. Evaluation of the stability of CRM candidate based on the retention time of peaks of each component (n=7)

Время удерживания пика, мин	Сорбитол	Маннитол	Трегалоза	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза
Среднее значение	2,468	2,749	3,142	4,286	7,550	9,556	17,954
Стандартное отклонение	0,038	0,040	0,041	0,082	0,168	0,183	0,533
RSD, %	1,54	1,46	1,30	1,91	2,23	1,92	2,97

Таблица 3. Оценка стабильности кандидата в СО по времени удерживания пиков каждого компонента, относительно пика глюкозы (n=7)

Table 3. Evaluation of the stability of CRM candidate based on the retention time of peaks of each component relative to the glucose peak (n=7)

Время удерживания пика, мин	Сорбитол	Маннитол	Трегалоза	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза
Среднее значение	0,58	0,64	0,73	1,00	1,76	2,23	4,19
Стандартное отклонение	0,006	0,006	0,007	0,000	0,012	0,016	0,065
RSD, %	1,03	0,94	0,96	0,00	0,68	0,72	1,55

Государственной фармакопеи РФ («фактор разрешения не менее 1,5; фактор симметрии 0,8–1,8; эффективность — не менее 2000 теоретических тарелок» [6, 9]), фармакопеи Евразийского экономического союза и Европейской фармакопее («фактор разрешения не менее 1,5; фактор симметрии 0,8–1,5; эффективность — не менее 2000 теоретических тарелок») [6, 7]. Высоты и площади пиков каждого компонента на хроматограммах кандидата в СО и свежеприготовленных растворов соответствуют друг другу (соотношение около 1).

Кроме вышеперечисленных параметров для оценки стабильности кандидата в СО оценивали стабильность абсолютного и относительного времени удерживания пиков каждого компонента в условиях воспроизводимости (табл. 2, 3).

Как показано в табл. 2, абсолютные времена удерживания пиков полиолов и трегалозы практически не меняются на протяжении всего периода хранения кандидата в СО (RSD не более 1,5%), тогда как времена удерживания остальных компонентов р-ра (глюкозы, лактозы, сахарозы и мальтозы) имеют большой разброс (RSD более 1,9%). Такое поведение пиков на хроматограммах, предположительно, может быть следст-

вием влияния незначительных колебаний содержания натрия гидроксида в составе подвижной фазы, приготовленной в условиях воспроизводимости (в разные дни, разными аналитиками). Пики глюкозы, лактозы и сахарозы могут быть установлены в качестве реперных, т. к. они находятся в середине хроматографического профиля (рис.). При этом время удерживания пика глюкозы наиболее стабильно в условиях воспроизводимости. Таким образом, были рассчитаны времена удерживания пиков каждого компонента СО относительно времени удерживания пика глюкозы (табл. 3).

Как показано в табл. 3, относительные времена удерживания пиков каждого компонента относительно пика глюкозы имеют достаточно стабильные значения (RSD не более 1,6%).

Таким образом, в качестве аттестованной характеристики кандидата в СО можно выбрать один или несколько параметров пика из вышеперечисленных (эффективность хроматографической колонки, фактор симметрии, абсолютное или относительное время удерживания и разрешение между пиками). Эффективность хроматографической колонки за весь период наблюдений значительно выше минимальных фармако-

пейных требований, а фактор симметрии уже имеет довольно узкий диапазон значений по фармакопейным требованиям. В свою очередь, фактор разрешения, являясь отношением разницы между временами удерживания пиков к сумме их ширины на полувысоте, позволяет одновременно контролировать и разрешение между пиками, и время удерживания. Следовательно, наиболее значимым параметром является фактор разрешения между пиками.

Таким образом, в качестве аттестованной характеристики кандидата в СО целесообразно установить допустимый диапазон значений фактора разрешения между парами пиков сорбитол/маннитол и маннитол/трегалоза, т. к. они имеют критически близкие и в то же время достаточно стабильные времена удерживания.

Значения фактора разрешения между пиками трегалоза/глюкоза, глюкоза/лактоза, лактоза/сахароза и сахароза/мальтоза значительно больше, чем значение минимального фактора разрешения, установленного регуляторными требованиями, однако имеют большой разброс — RSD 5,9–7,5% (табл. 1). Поэтому для пиков трегалоза/глюкоза, глюкоза/лактоза, лактоза/сахароза и сахароза/мальтоза целесообразно установить полуколичественную аттестованную характеристику в виде минимально допустимого значения фактора разрешения.

Присвоение аттестованной характеристики

Для установления значений аттестованной характеристики СО испытания проводили два оператора на двух хроматографических системах с применением колонок разных серий. Объем выборки — 46.

Диапазон значений фактора разрешения между парами пиков рассчитывали как среднее значение $X_{cp} \pm 2S$, где S — стандартное отклонение при $n=46$ [1, 4]. Полученные данные приведены в табл. 4.

Таким образом, в качестве значения аттестованной характеристики для кандидата

в СО установлен диапазон значений фактора разрешения между парами пиков сорбитол/маннитол $2,10 \pm 0,32$ и маннитол/трегалоза $2,50 \pm 0,36$. Для пар пиков трегалоза/глюкоза, глюкоза/лактоза, лактоза/сахароза и сахароза/мальтоза установлена полуколичественная аттестованная характеристика в виде минимально допустимого значения фактора разрешения — не менее 3,0. При установлении данной величины, помимо экспериментальных данных, учитывали фармакопейные требования к минимально допустимому значению фактора разрешения.

Выводы

В результате проведенных исследований разработан стандартный образец для внутрилабораторного контроля качества методики количественного определения стабилизаторов углеводной природы в составе биологических лекарственных препаратов методом ионообменной ВЭЖХ с импульсным амперометрическим детектированием. Стандартный образец представляет собой р-р семи стабилизаторов углеводной природы (сорбитол, маннитол, трегалоза дигидрат, глюкоза, лактоза, сахароза и мальтоза моногидрат) с концентрацией каждого компонента около 25 мкг/мл, разлитый в стеклянные ампулы по 2 мл. Консервант — азид натрия в конечной концентрации 0,05%.

Показана стабильность стандартного образца в течение минимум 14 мес. На основании оценки стабильности времен удерживания компонентов стандартного образца, а также значений фактора разрешения проведен выбор аттестованной характеристики и установлено ее значение: диапазон значений фактора разрешения между парами пиков сорбитол/маннитол $2,10 \pm 0,32$ и маннитол/трегалоза $2,50 \pm 0,36$; минимально допустимое значение фактора разрешения для пар пиков трегалоза/глюкоза, глюкоза/лактоза, лактоза/сахароза и сахароза/мальтоза — не менее 3,0.

Таблица 4. Значения факторов разрешения для пар пиков на хроматограммах кандидата в СО
Table 4. Resolution factor values for peak pairs in chromatograms of CRM candidate

№	Оператор	Сорбитол/ маннитол	Маннитол/ трегалоза	Трегалоза/ глюкоза	Глюкоза/ лактоза	Лактоза/ сахароза	Сахароза/ мальтоза
1	Оператор 1 Хроматограф 1 Колонка 2 (n=6)	2,20	2,60	6,07	10,47	4,28	11,15
	Стандартное отклонение	0,11	0,14	0,23	0,56	0,31	0,78
2	Оператор 1 Хроматограф 1 Колонка 1 (n=10)	2,3	2,7	6,1	10,9	4,6	11,5
	Стандартное отклонение	0,07	0,07	0,05	0,07	0,05	0,05
3	Оператор 2 Хроматограф 1 Колонка 1 (n=10)	2,2	2,7	6,1	10,9	4,6	11,6
	Стандартное отклонение	0,05	0,04	0,03	0,10	0,00	0,05
4	Оператор 1 Хроматограф 2 Колонка 1 (n=10)	2,0	2,3	5,9	10,6	4,3	11,8
	Стандартное отклонение	0,04	0,03	0,13	0,15	0,00	0,14
5	Оператор 1 Хроматограф 1 Колонка 2 (n=10)	2,0	2,4	5,7	9,7	4,0	10,2
	Стандартное отклонение	0,04	0,04	0,16	0,08	0,05	0,18
Среднее значение		2,1	2,5	6,0	10,5	4,4	11,3
Стандартное отклонение		0,16	0,18	0,22	0,52	0,26	0,65
Значение аттестованной характеристики ($X_{cp} \pm 2СКО$)		2,1 \pm 0,32	2,5 \pm 0,36	не менее 3,0			

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Волкова Р.А., Фадейкина О.В., Устинникова О.Б., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А., Меркулов В.А., Косенко В.В. Требования к материалам раздела по стандартным образцам, представляемым в doss'e на биологические лекарственные средства. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):7–20. [Volkova R.A. Fadeikina O.V., Ustinnikova O.B., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A., Merkulov V.A., Kosenko V.V. Trebovaniya k materialam razdela po standartnym obrazcam, predstavlyаемym v doss'e na biologicheskie lekarstvennyye sredstva [Requirements for the information on reference standards submitted in the dossier for biologicals]. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment]. 2024;24(1):7–20. (In Russian)]. DOI: 10.30895/2221-996X-2024-24-1-7-20.
- Минеро А.С., Рунова О.Б., Коротков М.Г., Устинникова О.Б. Разработка методики ионообменной ВЭЖХ для количественного определения стабилизаторов углеводной природы в биологических лекарственных препаратах. *Химико-фармацевтический журнал*. 2023;57(4):59–64. [Minero A.S., Rounova O.B., Korotkov M.G., Ustinnikova O.B. Razrabotka metodiki ionoobmennoj VEZHKh dlya kolichestvennogo opredeleniya stabilizatorov uglevodnoj prirody v biologicheskikh lekarstvennykh preparatah [Development of an ion-exchange HPLC technique for the quantitative determination of carbohydrate stabilizers in biological medicinal products]. *Chemical and Pharmaceutical Journal*. 2023;57(4):59–64. (In Russian)]. DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-4-59-64.
- Минеро А.С., Рунова О.Б., Коротков М.Г., Устинникова О.Б. *Определение стабилизаторов углеводной природы в биологически активных препаратах*. Патент ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. RU 2816030. МПК G01N 30/06 (2006.01), G01N 30/64 (2006.01), G01N 30/34 (2006.01). Заявка RU2023118379 А. Дата подачи 12.07.2023. Дата публ. 25.03.2024. [Minero A.S., Rounova O.B., Korotkov M.G., Ustinnikova O.B. *Opredelenie stabilizatorov uglevodnoj prirody v biologicheskii aktivnykh*

- preparatah [Determination of carbohydrate stabilizers in biologically active preparations]. Patent of FGBU "NCESMP" of Minzdrav Rossii. RU 2816030. MPK G01N 30/06 (2006.01), G01N 30/64 (2006.01), G01N 30/34 (2006.01). Application RU2023118379 A. Date of submission 12.07.2023. Date of publication 25.03.2024. (In Russian)].*
4. Фадейкина О.В., Волкова Р.А. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. [Fadeikina O.V., Volkova R.A. Razrabotka poryadka attestacii standartnyh obrazcov biologicheskikh lekarstvennyh sredstv [Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs]. *Chemical and Pharmaceutical Journal*. 2017;51(8):44–50. (In Russian)]. DOI: 10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50.
 5. Vjelosevic M., Zvonar Pobirk A., Planinsek O., Ahlin Grabnar P. Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimization. *Int. J. of Pharmaceutics*. 2020;76:1–12. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119029.
 6. Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration. *Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods*; FDA, Rockville, MD; 1994.
 7. https://eec.eaunion.org/upload/medialibrary/bd2/Farmakopeya-2020-t1_1.pdf
 8. <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>
 9. <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/khromatografiya/>
 10. <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/vysokoeffektivnaya-zhidkostnaya-khromatografiya/>
 11. Rayaprolu B.M., Strawser J.J., Gopal A. Excipients in parenteral formulations: selection considerations and effective utilization with small molecules and biologics. *Drug development and industrial pharmacy*: 2018;44(10):1565–1571. DOI: 10.1080/03639045.2018.1483392.
 12. Strickley R.G., Lambert W.J. A review of formulations of commercially available antibodies. *Journal of Pharmaceutical Science*. 2021;110(7):2590–2608. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.03.017.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Минеро Анастасия Сальвадоровна*, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
e-mail: minero@expmed.ru

Anastasia S. Minero*, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: minero@expmed.ru

Рунова Ольга Борисовна, к.х.н., ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
e-mail: runova@expmed.ru

Olga B. Rounova, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: runova@expmed.ru

Фадейкина Ольга Васильевна, к.б.н., ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
e-mail: fadeikina@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: fadeikina@expmed.ru

Волкова Рауза Асхатовна, д.б.н., ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
e-mail: volkova@expmed.ru

Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: volkova@expmed.ru

Устинникова Ольга Борисовна, к.б.н., ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России;
e-mail: ustinnikova@expmed.ru

Olga B. Ustinnikova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: ustinnikova@expmed.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ЭФФЕКТЫ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ D-ГЛЮКОЗЫ НА АКТИВНОСТЬ АМПА И НМДА РЕЦЕПТОРОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ НА СРЕЗАХ МОЗГА

А.А. Мокрушин

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

На переживающих срезах мозга обонятельной коры мозга крыс исследовали влияния различных концентраций D-глюкозы (0,5; 1; 3; 5; 7; 10; 12; 14; 17; 20; 22; 25 мМ) на изменения активностей АМПА и НМДА ионотропных глутаматергических механизмов. Зависимость амплитуд АМПА и НМДА потенциалов от концентрации D-глюкозы была куполообразной. Малые концентрации (0,5; 1; 3; 5 мМ) вызывали прогрессивное увеличение амплитуд АМПА и НМДА потенциалов. При концентрации глюкозы во внеклеточной среде 7, 10 мМ амплитуды АМПА и НМДА потенциалов были максимальными и стабильными. При концентрации D-глюкозы 14 мМ активности АМПА и НМДА механизмов снижались и при дальнейшем увеличении углевода необратимо блокировались. Долговременная посттетаническая потенциация (модель неассоциативного обучения) развивалась только при концентрации D-глюкозы 10 мМ. Белок теплового шока (Mw 70 кДа) протектировал активности АМПА и НМДА механизмов от негативного действия высокой гипергликемической концентрации D-глюкозы 14 мМ. Полученные данные показывают реакции АМПА и НМДА механизмов при развитии гипергликемии. Данную модель можно использовать для поиска веществ при защите нейронных механизмов в нервной ткани при развитии гипергликемического сахарного диабета.

Ключевые слова: срезы мозга крыс, АМПА, НМДА механизмы, D-глюкоза, гипергликемия

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование: работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН (№ 1023032400236-8-3.1.4).

Для цитирования: Мокрушин А.А. Эффекты высоких концентраций D-глюкозы на активность АМПА и НМДА рецепторов при моделировании гипергликемии на срезах мозга. *Биомедицина*. 2025;21(1):34–45. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-34-45>

Поступила 03.10.2024

Принята после доработки 13.01.2025

Опубликована 10.03.2025

EFFECTS OF ELEVATED D-GLUCOSE CONCENTRATIONS ON AMPA AND NMDA RECEPTOR ACTIVITY IN MODELED HYPERGLYCEMIA IN BRAIN SLICES

Anatoliy A. Mokrushin

I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences
19903, Russian Federation, St. Petersburg, Makarova Emb., 6

The effects of various D-glucose concentrations (0.5; 1; 3; 5; 7; 10; 12; 14; 17; 20; 22; and 25 mM) were studied using brain slices of the rat olfactory cortex to determine changes in the activities of AMPA and NMDA ionotropic glutamatergic mechanisms. The dependence of the amplitudes of the AMPA and NMDA potentials on D-glucose concentrations was dome-shaped. Lower concentrations (0.5; 1; 3; 5 mM) caused a progressive increase in the amplitudes of AMPA and NMDA potentials. Under D-glucose concentrations in the extracellular medium of 7 and 10 mM, the amplitudes of AMPA and NMDA potentials were maximal and stable. Under a D-glucose concentration of 14 mM, the activities of AMPA and NMDA mechanisms decreased and, following a further increase in carbon, were irreversibly blocked. Long-term post-tetanic potentiation (model of non-associative learning) developed only at a D-glucose concentration of 10 mM. Heat shock protein (Mw70 kDa) protected the activities of AMPA and NMDA mechanisms from the negative effects of high hyperglycemic D-glucose concentration of 14 mM. The data obtained indicate the response of AMPA and NMDA mechanisms during the development of hyperglycemia. This model can be used to search for substances to protect neuronal mechanisms in the nervous tissue during the development of hyperglycemic diabetes mellitus.

Keywords: rat brain slices, AMPA, NMDA mechanisms, D-glucose, hyperglycemia

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

Acknowledgment: the author expresses his gratitude to G.P. Smirnova for assistance in conducting the experiments, S.E. Borovikov for technical assistance in setting up and servicing the electrophysiological installation.

Funding: the study was supported by state funding allocated to the Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences (No. 1023032400236-8-3.1.4).

For citation: Mokrushin A.A. Effects of Elevated D-Glucose Concentrations on AMPA and NMDA Receptor Activity in Modeled Hyperglycemia in Brain Slices. *Journal Biomed.* 2025;21(1):34–45. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-34-45>

Submitted 03.10.2024

Revised 13.01.2025

Published 10.03.2025

Введение

Сахарный диабет — серьезное заболевание, снижающее качество жизни людей. В мире распространенность этого заболевания постоянно возрастает. У больных диабетом возникает высокое содержание глюкозы в крови (гипергликемия). При этом происходят нарушения во многих органах и тканях, но особенно серьезные и негативные возникают в ЦНС, что проявляется в когнитивных нарушениях. Глюкоза является основным источником энергии для мозга млекопитающих, необходимым для поддержания нормальной мозговой функции. Повышение внеклеточной концентрации глюкозы приводит к развитию гипергликемического состояния, и это является основным триггером диабетических когнитивных нарушений [7, 13, 15]. Когнитивные дефи-

циты наблюдались и в экспериментальных моделях диабета, такие как нарушение сенсорного восприятия, а также дефицит рабочих и пространственных функций памяти. Более того, выявлено развитие негативных изменений процессов обучения и формирования памяти [8, 12, 23, 24]. В опытах на животных эти изменения проявились при развитии долговременной посттетанической потенциации (ДПП), которая рассматривается как экспериментальная модель обучения и формирования памяти [2].

Известно, что развитие ДПП связано с активацией ионотропных глутаматергических рецепторных АМПА (α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота) и НМДА (N-метил-D-аспаргат) механизмов. Однако гиперактивация НМДА рецепторов вызывает повреждение нейронов за счет

увеличения внутриклеточной концентрации ионов кальция. Эти изменения индуцируют целый комплекс нарушений в клетках: образование свободных радикалов, активация протеаз, фосфолипаз и эндонуклеаз. Обнаружено, что пролонгация таких изменений в нейронах приводит к серьезным нейродегенеративным заболеваниям, таким как ишемический инсульт, травма и эпилепсия [14, 22].

Учитывая, что ионотропные глутаматергические рецепторные механизмы являются ключевыми в адаптации организма к окружающей среде, для лечения диабетических нарушений в мозге важно знать, какие изменения происходят в глутаматных АМПА и НМДА рецепторах при развитии гипергликемии и возможна ли их защита от действия высоких концентраций D-глюкозы.

Целью нашего исследования было определение характера изменений активностей АМПА и НМДА-зависимых механизмов при действии на них различных концентраций D-глюкозы. В работе мы сосредоточились на изучении процессов, связанных с развитием гипергликемии. Для выяснения этих процессов опыты проводились на переживающих срезах обонятельной коры мозга крыс, чтобы получить ответ, как модифицируются активности этих рецепторных механизмов при моделировании гипергликемических изменений АМПА и НМДА механизмов.

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс-самцов популяции линий Wistar массой 180–200 г. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Исследования проведены на тангенциальных срезах обонятельной коры мозга крыс толщиной 400–500 мкм. Крыс декапитировали, извлекали головной мозг и готовили срезы специальным резаком [1, 2]. Срезы

переносили в стеклянную вials объемом 1 мл с искусственной цереброспинальной жидкостью (ИЦЖ), составом (мМ): 124,0 NaCl; 5,0 KCl; 2,6 CaCl₂; 1,24 KH₂PO₄; 1,2 MgSO₄; 3,0 NaHCO₃; 10,0 глюкозы; pH=7,3 при 37°C. Флаконы со срезами устанавливали в аппарат Варбурга (Германия) и прerinкубировали в течение 1 ч.

Затем срезы переносили в регистрационную камеру электрофизиологической установки [4], непрерывно перфузировали ИЦЖ со скоростью 2,0 мл/мин и проводили регистрацию электрической активности. При электрической стимуляции латерального обонятельного тракта (ЛОТ) внеклеточно регистрировали фокальные потенциалы (ФП). ФП является многокомпонентным потенциалом и состоит из пресинаптического компонента, который отражает активность проводящих волокон ЛОТ — суммарный потенциал действия (ПД ЛОТ), и постсинаптических компонентов, которые отражают активацию ионотропных глутаматергических рецепторов — АМПА потенциал и НМДА потенциал (рис. 1).

АМПА и НМДА потенциалы (мкВ) регистрировали стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl, с сопротивлением 1–5 МОм. Эти потенциалы возникали на электрические стимулы, подаваемые на ЛОТ от электростимулятора (ЭСУ-1, Россия) прямоугольной формы, длительностью 0,1 мс, интенсивностью 1–3 В и частотой 0,003 Гц. Потенциалы усиливали (НТО, Россия), оцифровывали аналого-цифровым прибором (Е 20-10, Россия) и обрабатывали компьютерной программой «Анализ электрической активности нейронов» (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия).

Химические компоненты для приготовления инкубационных растворов и D-глюкозы были приобретены в фирме «Химреактив» (Россия), «БТШ70» (Институт цитологии РАН).

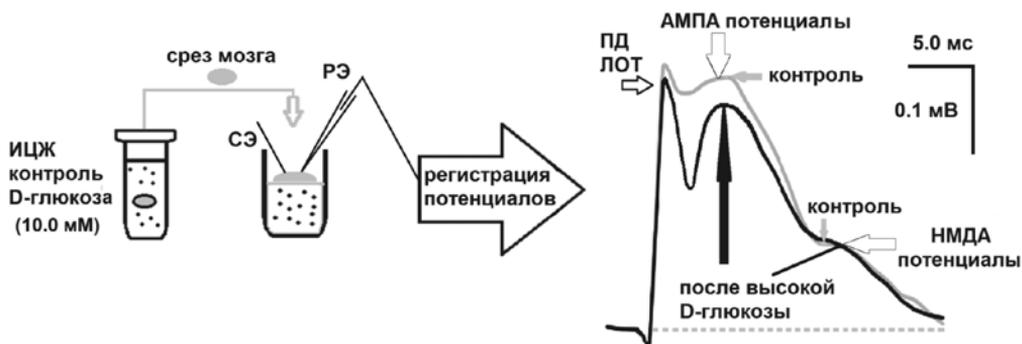


Рис. 1. Экспериментальная модель для изучения эффектов различной концентрации D-глюкозы на ионотропные глутаматергические АМПА и НМДА рецепторы.

Примечание: срез мозга инкубировался в ИЦЖ с концентрацией D-глюкозы 10 мМ, затем переносился в вилу с тестируемой концентрацией D-глюкозы. Для регистрации АМПА и НМДА потенциалов срез помещали в регистрирующую камеру электрофизиологической установки. СЭ — стимулирующий электрод, РЭ — регистрирующий электрод. Справа на схеме: суммарный потенциал, регистрируемый в срезе в ответ на электрическую стимуляцию ЛОТ с указанием регистрируемых компонентов: АМПА и НМДА потенциалы (мкВ), также суммарный потенциал действия проводящих волокон ЛОТ — ПДЛОТ (в работе не анализировался). Серый профиль ФП — контроль, черный — ФП при действии изменений концентрации D-глюкозы. Пунктирная линия представляет изолинию — потенциал среза в состоянии покоя; стрелки показывают точки измерения амплитуд АМПА и НМДА потенциалов. Калибровка как указана.

Fig. 1. Experimental model for studying the effects of various D-glucose concentrations on ionotropic glutamatergic AMPA and NMDA receptors.

Note: a brain slice was incubated in a control ИЦЖ with a D-glucose concentration of 10 mM followed by placing in a vial with the tested concentration of D-glucose. To record the АМПА and НМДА potentials, the slice was placed in the recording chamber of an electrophysiological setup. СЭ is a stimulating electrode, РЭ is a recording electrode. On the right of the diagram: the total potential recorded in the slice in response to electrical stimulation of the ЛОТ with an indication of the recorded components: АМПА and НМДА potentials (μV), as well as the total action potential of the conductive fibers of the ЛОТ — ПДЛОТ (not analyzed in the study). The gray profile of the ФП is the control, the black one is the ФП under the influence of changes in the concentration of D-glucose. The dotted line represents the isoline — the resting potential; the arrows indicate the measurement points of the амплитуд АМПА and НМДА потенциалов. Calibration as indicated.

Статистическую обработку изменений амплитуд АМПА и НМДА потенциалов осуществляли с применением непараметрического параметра Вилкоксона—Манна—Уитни (U-критерия). Цифровые данные выражали как среднее значение и его стандартную ошибку. Уровень статистической значимости составлял $p \leq 0,05$.

Дизайн экспериментов по исследованию эффектов различных концентраций D-глюкозы на срезы проводился в следующей последовательности. Срезы в течение 20 мин перфузировали ИЦЖ в проточной камере электрофизиологической установки [4] и регистрировали амплитуды АМПА

и НМДА потенциалов (мкВ). Затем срезы перфузировали ИЦЖ с тем же солевым составом с добавлением D-глюкозы в концентрациях: 0,5; 1; 3; 5; 7; 10; 12; 14; 17; 20; 22; 25 мМ в течение 20 мин и регистрировали АМПА и НМДА потенциалы.

Приготовление растворов с различной концентрацией D-глюкозы осуществляли следующим образом. Контрольная концентрация D-глюкозы была 10 мМ, поскольку при этой концентрации жизнедеятельность срезов, оцениваемая по амплитудам АМПА и НМДА потенциалов, сохранялась в течение более 1 ч. Другие концентрации D-глюкозы готовили либо снижением, либо

увеличением до указанных концентраций. Для регуляции осмолярности растворов с повышенной или пониженной концентрацией D-глюкозы применяли метод снижения или увеличения концентрации NaCl, соответственно, в растворе до значений 290–300 мОсм/кг, которые для крови считаются нормальными, с помощью измерения на осмометре ОСКР-1М (Россия).

Срезы перфузировали ИЦЖ с одной из концентраций D-глюкозы в течение 30 мин. В течение этого времени регистрировали амплитуды АМПА и НМДА потенциалов после воздействия на них соответствующей концентрации D-глюкозы. Сопоставляя амплитуды АМПА и НМДА потенциалов при воздействии углевода с их контрольными значениями, определяли степень их изменений.

Опыты по исследованию D-глюкозы в разных концентрациях на развитие НМДА-зависимой ДПП проводились в следующей последовательности. Были выбраны три критические концентрации D-глюкозы на основании результатов наших исследований, представленных на рис. 2: 3, 10, 14 мМ. В каждом срезе в течение 15 мин регистрировали амплитуды НМДА потенциалов, эти значения были контрольными. Затем проводилась тетанизация ЛОТ электрическими импульсами с частотой 100 Гц длительностью 15 с. Далее регистрировали амплитуды НМДА потенциалов во временных интервалах, указанных на оси абсцисс рис. 3.

При исследовании протективных влияний белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70) последовательность экспериментов была следующей. При воздействии контрольных значений D-глюкозы (10 мМ) измеряли амплитуду НМДА потенциалов на отдельной группе срезов, и эти значения рассматривались как контрольные. В другой группе срезов измерялась амплитуда НМДА потенциалов в концентрации D-глюкозы 14 мМ. Третья группа срезов сначала инкубировалась с БТШ70

(70 мкг/мл) в течение 20 мин. После этого времени на срезы апплицировали D-глюкозу (14 мМ). После такой обработки срезов были измерены амплитуды НМДА потенциалов и сопоставлены со значениями амплитуд в контрольной группе.

Результаты исследований

В начале исследований в срезах были протестированы эффекты различных концентраций D-глюкозы на активность ионотропных глутаматергических АМПА и НМДА рецепторов, определяемых по амплитуде потенциалов. Каждую концентрацию D-глюкозы тестировали на отдельной группе срезов. Зависимость амплитуд АМПА и НМДА потенциалов от концентрации D-глюкозы была куполообразной (рис. 2). Сначала были исследованы эффекты концентраций 0,5 и 1 мМ глюкозы, которые соответствуют нормогликемии для мозга в условиях *in vivo* для крыс и человека [13, 19]. При действии 1 мМ амплитуды АМПА и НМДА потенциалов глюкозы были ингибированы и составляли 27 ± 5 и 65 ± 8 мкВ соответственно. Еще более выраженное угнетение было при 0,5 мМ амплитуды АМПА и НМДА потенциалов: до 40 и 10 мкВ (рис. 2).

Возрастающие концентрации действия глюкозы (3, 5, 7 мМ) вызывали увеличение амплитуд АМПА и НМДА потенциалов до 10 мМ, причем изменения этих кривых были конгруэнтны. Увеличение концентрации D-глюкозы до 12 мМ вызывало снижение амплитуд АМПА и НМДА потенциалов, но эти изменения были статистически недостоверны. Критические изменения с активностью АМПА и НМДА механизмов обнаружены при увеличении концентрации D-глюкозы до 14 мМ. Следует отметить, что АМПА-зависимые механизмы были более устойчивы, чем НМДА-зависимые механизмы (рис. 2). Испытания других более высоких концентраций (17, 20, 22, 25 мМ) D-глюкозы, которые соответствуют состоя-

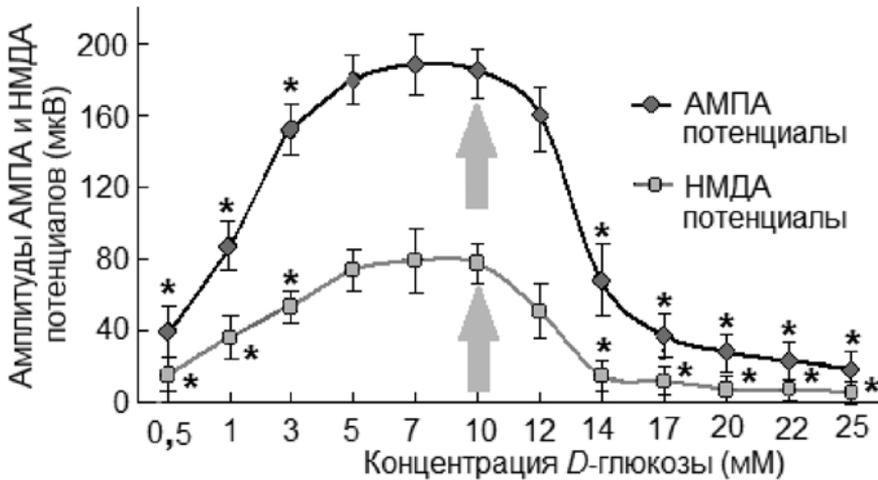


Рис. 2. Эффекты воздействия D-глюкозы в различных концентрациях на амплитуды АМПА и НМДА потенциалов.

Примечание: стрелками указана контрольная концентрация D-глюкозы. Эффекты каждой концентрации D-глюкозы изучались на отдельной группе срезов ($n=7$). Каждая точка на кривых представляет собой усредненные значения (мкВ). Различия амплитуд АМПА и НМДА потенциалов по сравнению с контрольными значениями определяли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, $p \leq 0,05$ (*).

Fig. 2. D-glucose effects in various concentrations on the amplitudes of the AMPA and NMDA potentials.

Note: the arrows indicate the control concentration of D-glucose. The effects of each concentration of D-glucose were studied on a separate group of slices ($n=7$). Each point on the curves represents the mean values (μV). Differences in the amplitudes of the AMPA and NMDA potentials compared to the control values were determined using the nonparametric Wilcoxon–Mann–Whitney U-test, $p \leq 0.05$ (*).

нию комы, выявили монотонный характер изменений АМПА и НМДА механизмов. Амплитуды резко снижались, и кривые изменений амплитуд АМПА и НМДА потенциалов были параллельны оси абсцисс. Эти данные указывают, что активности ионотропных глутаматергических рецепторов ингибируются при высоком уровне D-глюкозы. Восстановить активность этих механизмов не удалось при отмывании контрольным р-ром D-глюкозы (10 мМ), что свидетельствует о необратимости процессов ингибирования.

Следующий этап работы заключался в исследовании эффектов различных концентраций D-глюкозы на развитие ДПП, поскольку в клинике выявлено существенное снижение процессов обучения и памяти

при диабете. Известно, что НМДА рецепторы «ответственны» за синаптическую пластичность в срезах обонятельной коры мозга [2].

При воздействии на срезы контрольной концентрации D-глюкозы (10 мМ) возникла стабильная ДПП с фазой индукции 5 мин и длительностью ДПП 70 мин (рис. 3). Нормогликемическая концентрация D-глюкозы (1 мМ) вызывала только кратковременное увеличение НМДА потенциалов на 26% по сравнению с состоянием до тетанизации. Эффекты влияния D-глюкозы (3 мМ) проявлялись только в развитии фазы индукции ДПП (5 мин). Затем амплитудные значения ДПП снижались во временном интервале 10–40 мин, что указывает на развитие сохраняющей-

ся посттетанической депрессии (ПДД), что свидетельствует о необратимости угнетения (рис. 3). Данные на кривой при этой концентрации D-глюкозы достоверно отличаются от значений контрольной кривой (U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, $p \leq 0,05$).

Особый интерес вызывают данные о развитии ДПП при «критической» концентрации D-глюкозы 14 мМ — состояние комы (рис. 3). Фаза индукции ДПП была до 5 мин, но амплитудные значения были меньше по сравнению с действием D-глюкозы 3 и 10 мМ.

Во временном интервале 5–20 мин увеличивалась амплитуда НМДА потенциалов, которую следует рассматривать как крат-

ковременную потенциацию. С 20–40 мин наблюдалось прогрессивное снижение амплитуд ДПП, которое можно расценить как депрессию (рис. 3). В этом временном интервале данные статистически отличаются от значений контрольной кривой (U-критерия, Вилкоксона—Манна—Уитни, $p \geq 0,05$).

Цель следующей серии опытов заключалась в обнаружении вещества, протектирующего глутаматергические рецепторы от негативных влияний диабетической/коматозной концентрации D-глюкозы (14 мМ). В качестве протектора был использован БТШ70. Протективный эффект белка оценивался на сохранение активности

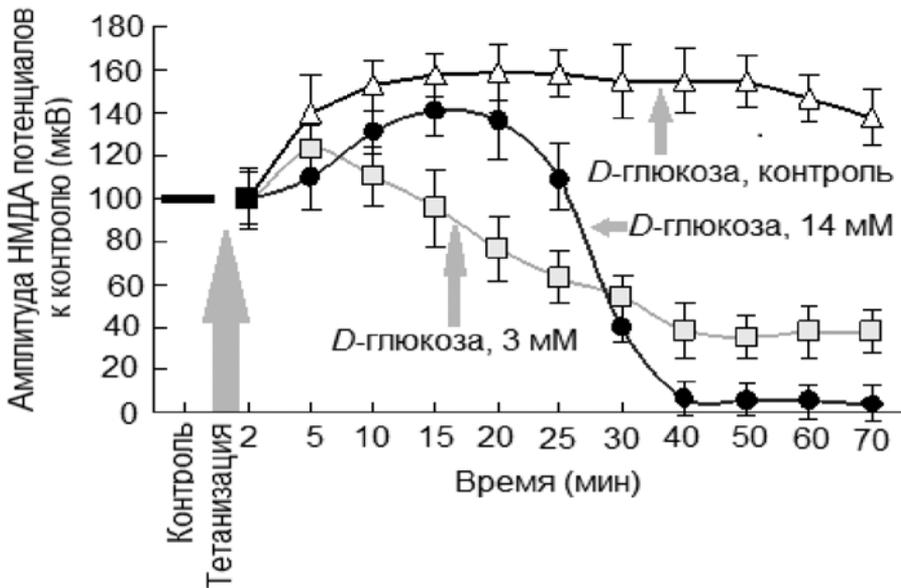


Рис. 3. Эффекты критически важных концентраций D-глюкозы (3, 14 мМ) по сравнению с контрольной концентрацией (10 мМ) на развитие ДПП НМДА механизмов.

Примечание: каждая точка на кривых — суммарное значение при действии концентрации D-глюкозы 3 мМ (n=5); 10 мМ (n=6); 14 мМ (n=7). Различия амплитуд НМДА потенциалов по сравнению со значениями при концентрации D-глюкозы 10 мМ (контроль) определяли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, $p \leq 0,05$. Подробности статистического анализа приведены в тексте.

Fig. 3. Effects of critically important concentrations of D-glucose (3, 14 mM) compared against the control concentration (10 mM) on the development of DPP of NMDA mechanisms.

Note: each point on the curves is the total value under the action of a D-glucose concentration of 3 mM (n=5); 10 mM (n=6); 14 mM (n=7). Differences in the amplitudes of NMDA potentials compared with the values at a D-glucose concentration of 10 mM (control) were determined using the nonparametric Wilcoxon–Mann–Whitney U-test, $p \leq 0.05$. Details of the statistical analysis are given in the text.

НМДА механизмов (НМДА потенциалы). Последовательность экспериментов описана в разделе «Материалы и методы» и показана на рис. 4. Проведенные эксперименты показали, что предварительная инкубация срезов БТШ70 протектировала амплитуду НМДА потенциалов от ингибирующего влияния «коматозной» концентрации D-глюкозы 14 мМ (76 мкВ, контроль *vice versa* 67 мкВ, БТШ70 + D-глюкоза; $U=12$, $n=7$, $p \leq 0,05$) (рис. 4). Протективный эффект белка, как показали исследования, сохранялся и при отмывании срезов от воздействия БТШ70 и D-глюкозы (76 мкВ, контроль *vice versa* 78 мкВ, БТШ70 + D-глюкоза; $U=11$, $n=7$, $p \leq 0,05$) (рис. 4).

Обсуждение результатов

Таким образом, проведенные нами исследования показывают, что активация ионотропных глутаматергических АМПА и НМДА рецепторов происходит трехфазно. В первой фазе при действии нормогликемических концентраций D-глюкозы (0,5; 1 мМ) активности АМПА и НМДА механизмов были ингибированы, очевидно, за счет недостаточного энергетического обеспечения. Эти данные указывают на развитие гипогликемии и ишемического состояния нейронов мозга. Однако следует отметить, что при этих концентрациях D-глюкозы АМПА и НМДА механизмы продолжают выполнять свои функции. Они генерируют

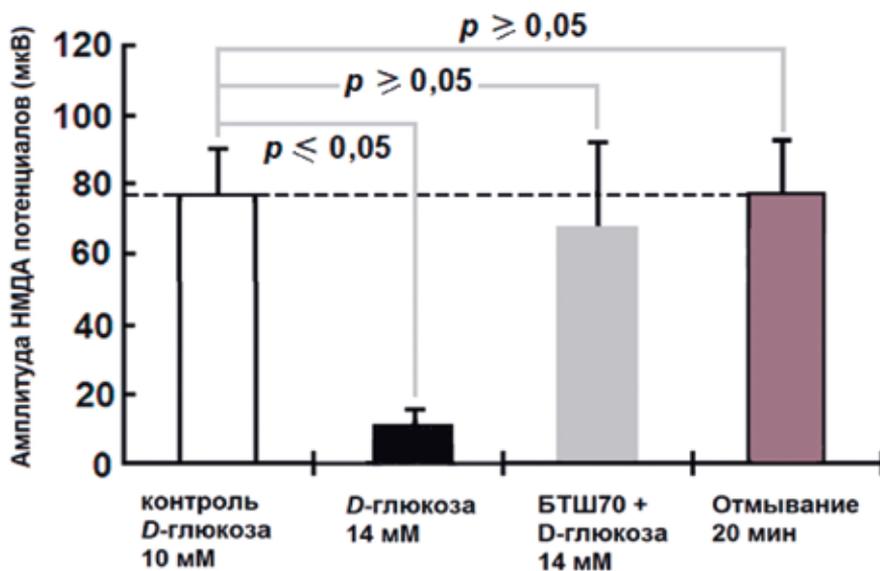


Рис. 4. БТШ70 (70 мкг/мл) защищает активность НМДА механизмов при действии высокой концентрации D-глюкозы (14 мМ).

Примечание: данные представляют собой средние значения ($n=7$). Различия амплитуд НМДА потенциалов по сравнению со значениями при концентрации D-глюкозы 10 мМ (контроль) определяли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, $p \leq 0,05$. Пунктирная линия — уровень значений амплитуд при действии контрольной концентрации D-глюкозы (10 мМ).

Fig. 4. БТШ70 (70 $\mu\text{g/ml}$) protects the activity of NMDA mechanisms under the influence of an evaluated concentration of D-glucose (14 mM).

Note: the data represent mean values ($n=7$). Differences in the amplitudes of NMDA potentials compared to the values at a D-glucose concentration of 10 mM (control) were determined using the nonparametric Wilcoxon–Mann–Whitney U-test, $p \leq 0,05$. The dotted line is the level of amplitude values under the influence of the control concentration of D-glucose (10 mM).

электрические потенциалы и транслируют их другим нейронам в кортикальной нейросети, хотя и в редуцированном виде. При дальнейшем увеличении концентрации D-глюкозы (3, 5 мМ) (первая фаза) активности АМПА и НМДА рецепторов возрастают. Во второй фазе в узком диапазоне действия D-глюкозы (7, 10 мМ) активности АМПА и НМДА рецепторов были максимальными и стабильными, что указывает на максимальное обеспечение работы АМПА и НМДА механизмов. Отметим, что обнаруженные нами изменения активности АМПА и НМДА рецепторов развиваются при действии концентраций D-глюкозы во второй фазе и в клинике рассматриваются как гипергликемические. Вероятно, в таких диапазонах концентраций D-глюкозы развивается эксайтотоксичность, которая характеризуется выделением избыточных концентраций медиатора глутамата из синаптических терминалей и необратимым нарушением функционирования АМПА и НМДА механизмов. Такое предположение подтверждается тем, что в гиппокампе обнаружено резкое повышение концентрации глутамата во внеклеточной среде и возникновение гиперактивности на ранней стадии развития диабета [10].

В третьей фазе при действии D-глюкозы (14 мМ и более) усиливается гипергликемическое ингибирование АМПА и НМДА механизмов. При интерпретации полученных данных можно говорить, что гипергликемические изменения АМПА и НМДА механизмов сначала активируются, затем необратимо блокируются.

В свете представленных экспериментальных данных возникает вопрос. Почему в настоящем исследовании контрольный оптимальный диапазон концентрации D-глюкозы был 10 мМ, тогда как в клинике принято считать, что верхний уровень нормального уровня D-глюкозы в крови составляет 5,5–6,0 ммоль/л? Уровень D-глюкозы больше 15,2 ммоль/л и выше рассматрива-

ется как возникновение сахарного диабета [21]. Это противоречие объясняется тем, что в целом организме регуляция обмена D-глюкозы осуществлялась другими тканями: печенью, поджелудочной железой (β-клетки), почками, поперечнополосатыми мышцами. В срезах мозга такая системная регуляция D-глюкозы отсутствует, что делает этот экспериментальный объект оптимальным для исследования процессов начальных стадий реакции глутаматных рецепторных механизмов в «чистом» виде. Кроме того, установлено, что оптимальный диапазон D-глюкозы для нормального и длительного (10–12 ч) функционирования срезов мозга составляет 10 мМ. Такая концентрация D-глюкозы принята нами в качестве контрольной.

Трехфазный характер возрастающих концентраций D-глюкозы подтвердился в другой серии исследований при изучении ДПП, которую рассматривают как проявление процессов неассоциативного обучения и формирования памяти [21]. Отметим, что многие исследователи обнаружили негативные влияния избыточных доз глюкозы на высшие формы деятельности нервной системы — обучение и память [6, 19, 21], что указывает на формирование когнитивных нарушений.

В настоящей работе мы обнаружили, что ДПП значительно изменялась в концентрации D-глюкозы 14 мМ по сравнению с контрольной концентрацией углевода 10 мМ. Это проявлялось в уменьшении временных и амплитудных значений фазы индукции ДПП. Однако при этом развивалась кратковременная потенциация в течение 10 мин. Затем она трансформировалась в стабильную депрессию, развитие которой свидетельствует об ингибировании процессов обучения и формирования следов памяти. Увеличение концентрации D-глюкозы во внеклеточной среде до 20–25 мМ блокировало развитие ДПП. Нарушения развития ДПП в срезах мозга подтверждаются

результатами исследования на срезах гиппокампа крыс с экспериментально вызванным диабетом [5, 9, 18, 20], а также в нейронах соматосенсорной коры мышей с стрептозотоциновым диабетом [10, 11, 21].

В результате проведенных исследований было обнаружено, что при низкой концентрации углевода (1, 3 мМ) не выявились основные признаки ДПП: фаза индукции и кратковременная потенциация. По нашему мнению, это свидетельствует о том, что процессы обучения и памяти блокируются при развитии этого вида диабета. Такой вывод подтверждается результатами нарушения памяти у крыс при моделировании диабета первого типа [6].

Мы задались вопросом, возможно ли нормализовать функции глутаматергических механизмов при больших гипергликемических концентрациях D-глюкозы (14 мМ и более)? Ранее нами было выявлено, что белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70) эффективно протектировал активность АМПА и НМДА-зависимых механизмов от негативных влияний «тяжелой» 10 мин аноксии [3].

Эту гипотезу мы проверили на наиболее уязвимых к действию цитотоксических факторов — НМДА механизмах при регистрации НМДА потенциалов. Результаты исследований выявили, что предварительная инкубация срезов с БТШ70 способствовала сохранению активности НМДА механизмов от угнетающего влияния гипергликемической концентрации D-глюкозы (14 мМ). Эти данные, по нашему мнению, свидетельствуют об эффективной защите НМДА механизмов БТШ70 при развитии такой стадии диабета. Следует подчеркнуть, что протективный эффект белка сохраняется и при отмывании срезов от воздействия БТШ70 и D-глюкозы.

Подводя итог полученным данным, на вопрос, поставленный выше, о возможности сохранить нормальное функционирование глутаматергических механизмов при дейст-

вии высоких концентраций, можно ответить утвердительно. Этот вывод подтверждается данными о протективных эффектах других веществ, например эксендина-4, который является структурным аналогом глюкагоноподобного пептида-1 у крыс с развитием стрептозотоцинового диабета [24]. Нейропротекторный эффект обнаружен при испытании 3',4'-дигидроксибензилгликоля у крыс с диабетом первого типа [17].

Следует отметить, что существуют вещества эндогенного происхождения без негативных последствий с потенциальным протективным вектором действия. Такие, например, как КРФ-подобный белок мистиксин, который защищал глутаматные рецепторы от тяжелой аноксии (10 мин) [16]. Мы уверены, что будут найдены другие эффективные протекторы для защиты глутаматергических механизмов в мозге от негативных влияний развития диабета.

Заключение

Таким образом, мы на срезах мозга имитировали начальные стадии развития гипергликемии при действии различных концентраций D-глюкозы. Обнаружено, что ионотропные глутаматергические рецепторы (АМПА и НМДА) нелинейным (трехфазным) образом реагируют на действие D-глюкозы при увеличении концентраций. При малых концентрациях возникает ингибирование, при средних оптимальных (10 мМ) значениях — максимальная активация; при больших — блокада активностей АМПА и НМДА механизмов. Неассоциативная модель обучения и памяти — ДПП успешно развивалась только при оптимальной концентрации D-глюкозы. Удалось выявить, что БТШ70 эффективно протектировал активности АМПА и НМДА механизмов от негативного действия высокой концентрации D-глюкозы. Для клиники важно, что полученные данные раскрывают различные этапы развития процессов сахарной гипергликемии в нервной системе,

где «главный удар» принимают на себя АМПА и НМДА механизмы. Применение данной модели дает возможность провести скрининг фармакологических препаратов,

защищающих нейрональные механизмы, как на начальных этапах развития разных стадий сахарного диабета, так и для изучения последствий диабетической нейропатии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Митюшов М.И., Емельянов Н.А., Мокрушин А.А., Войнер И.А., Багаева Т.Р. *Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрохимического исследования*. Л.: Наука, 1986:127. [Mityushov M.I., Emelianov N.A., Mokrushin A.A., Voyner I.A., Bagaeva T.R. *Perezhivayushchij srez mozga kak ob'ekt nejrofiziologicheskogo i nejrohimicheskogo issledovaniya* [The surviving brain slice as an object of neurophysiological and neurochemical research]. Leningrad: Nauka Publ., 1986:127. (In Russian)].
2. Мокрушин А.А. *Пептид-зависимые механизмы нейрональной пластичности в обонятельной коре: дис. ... д-ра биол. наук*. СПб.: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 1997:397. [Mokrushin A.A. *Peptid-zavisimye mekhanizmy nejronal'noj plastichnosti v obonyatel'noj kore* [Peptide-dependent mechanisms of neuronal plasticity in the olfactory cortex]: diss. ... Dr. of Biol. Sci. St. Petersburg: I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, 1997:397. (In Russian)].
3. Мокрушин А.А., Павлинова Л.И., Гужова И.В., Маргулис Б.А. Эффекты экзогенного белка теплового шока (HSP70) на глутаматергическую синаптическую передачу в обонятельной коре мозга крыс *in vitro*. *Доклады Академии Наук*. 2004;395(4):551–553. [Mokrushin A.A., Pavlinova L.I., Guzova I.V., Margulis B.A. Effekty ekzogennoho belka teplovogo shoka (HSP70) na glutamatergicheskuyu sinapticheskuyu peredachu v obonyatel'noj kore mozga kryis *in vitro* [Effects of Exogenous heat shock protein (Hsp70) on glutamatergic synaptic transmission in rat olfactory cortex *in vitro*]. *Dokl. Acad. of Sci.* 2004;395(4):551–553. (In Russian)].
4. Мокрушин А.А., Боровиков С.Е. Установка для изучения гипотермических эффектов на переживающих срезах мозга теплокровных. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017;2(2):214–217. [Mokrushin A.A., Borovikov S.E. Ustanovka dlya izucheniya gipotermicheskikh effektoy na perezhivayushchih srezah mozga teplokovnykh [Installation for the study of hypothermic effects on the brain surviving slices of warm-blooded]. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnykh fundamental'nykh issledovaniy* [International Journal of Applied Fundamental Research]. 2017;2(2):214–217. (In Russian)].
5. Biessels G.J., Kamal A., Ramakers G.M. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1996;45:1259–1267.
6. Brossaud J., Bosch-Bouju C., Marissal-Arvy N., Campas-Lebecque M.-N., Webster S.P., Walker B.R., Moisan W.-P. Memory deficits in a juvenile rat model of type 1 diabetes are due to excess 11 β -HSD1 activity, which is upregulated by high glucose concentrations rather than insulin deficiency. *Diabetologia*. 2023;66(9):1735–1747. DOI: 10.1007/s00125-023-05942-3.
7. Cukierman T., Gerstein H.C., Williamson J.D. Cognitive decline and dementia in diabetes—systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia*. 2005;48:2460–2469. DOI: 10.1007/s00125-005-0023-4.
8. Di Mario U., Morrano S., Valle E. Electrophysiological alteration of the central nervous system in diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 1995;11:259–277.
9. Fang F., Xu L., Zhang R., Liu L., Tang M. Neuronal Hyperactivity in the Hippocampus during the Early Stage of Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes in Mice. *Neuroendocrinology*. 2024;114(4):356–364.
10. Garcia-Magro N., Mesa-Lombardo A., Barros-Zulaica N., Nuñez Á., Artola A., Kamal A., Gispen W.H. Diabetes mellitus concomitantly facilitates the induction of long-term depression and inhibits that of long-term potentiation in hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 2005;22:169–178. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04205.x.
11. Garcia-Magro N., Mesa-Lombardo A., Barros-Zulaica N. Impairment of synaptic plasticity in the primary somatosensory cortex in a model of diabetic mice. *Front Cell Neurosci.* 2024;30:18–25. DOI: 10.3389/fncel.2024.1444395.
12. Gispen W.H., Biessels G.J. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 2000;23:542–549.
13. Gruettter R., Novothy E.J., Boulware S.D., Rothman D.L. Direct measurement of brain glucose concentrations in humans by 13 C NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992;89:1109–1112.
14. Hristov M., Nankova A., Andreeva-Gateva P. Alterations of the glutamatergic system in diabetes mellitus. *Metab. Brain Dis.* 2023;39(2):321–333. DOI: 10.1007/s11011-023-01299-z.
15. Liu D., Zhang H., Gu W., Zhang M. Effects of exposure to high glucose on primary Cultured hippocampal neurons: involvement of intracellular ROS accumulation. *Neurological Science*. 2014;35(6):831–837.
16. Mokrushin A.A. Mystixin-7 mini-peptide protects ionotropic glutamatergic mechanisms against oxygen-glucose deprivation *in vitro*. *Neuropeptides*. 2015;54:163–168.
17. Rodriguez-Perez M.D., Perez de Algaba I., Martin-Aurioles E. Dihydroxyphenylglycol In Type-1-like Diabetic Rats-Influence of the Hydroxytyrosol/3',4-dihydroxyphenylglycol Ratio. *Nutrients*. 2022;14(6):1146. DOI: 10.3390/nu14061146.

18. Sasaki-Hamada S., Sacai H., Oka J.-I. Diabetes onset influences hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-treated rats. *Neuroscience*. 2012;227:293–304. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.081.
19. Silver I.A., Ereciaska M. Extracellular Glucose Concentration in Mammalian Brain: Continuous Monitoring of Changes during Increased Neuronal Activity and upon Limitation in Oxygen Supply in Normo-, Hypo-, and Hyperglycemic Animals. *The Journal of Neuroscience*. 1994;14(8):5068–5076.
20. Trudeau F., Sylvain G., Guy M. Hippocampal synaptic plasticity and glutamate receptor regulation: influences of diabetes mellitus. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;490(1–3):177–186. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.02.055.
21. Valastro B., Cossette J., Lavoie N., Gagnon S., Trudeau F. Up-regulation of glutamate receptors is associated with LTP defects in the early stages of diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2002;45:642–650. DOI: 10.1007/s00125-002-0818-5.
22. Volianskis A., France G., Jensen M.S., Bortolotto Z.A., Jane D.E., Collingridge G.L. Long-term potentiation and the role of N-methyl-d-aspartate receptors. *Brain Research*. 2015;1621:5-16. DOI: 10.1016/J.Brainres.2015.01.016.
23. Yin H., Wang W., Yu W., Li J. Changes in Synaptic Plasticity and Glutamate Receptors in Type 2 Diabetic KK-Ay Mice. *Journal of Alzheimer's disease*. 2017;57(4):1207–1220. DOI: 10.3233/JAD-160858.
24. Zanotto C., Hansen F., Galland F., Batassini C. Glutamate-tergic Alterations in STZ-Induced Diabetic Rats Are Reversed by Exendin-4. *Molecular Neurobiol.* 2019;56(5):3538–3551. DOI: 10.1007/s12035-018-1320-5.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ | INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

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

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



СРАВНЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ АФЛИБЕРЦЕПТА, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ CHO И CHO-GS

С.С. Тимонова*, И.А. Кирик, Д.Т. Зарипова, Р.И. Фарсиева, И.А. Каргополов,
Р.Л. Анисимов, А.А. Пискунов, Р.А. Хамитов

АО «ГЕНЕРИУМ»

601125, Российская Федерация, Владимирская обл., Петушинский р-н,
п. Вольгинский, ул. Владимирская, 14

Тип селекционного маркера и условия селекции являются одними из ключевых стадий при получении продуцентов, экспрессирующих рекомбинантные белки. Получение клеточных линий — продуцентов афлиберцепта на основе клеток линии CHO и CHO-GS позволило сравнить и выявить наиболее подходящий вариант клеточной линии для получения препарата. В результате работы получены по 10 моноклональных клеточных линий — продуцентов предполагаемого биоаналога афлиберцепта на клеточных платформах CHO и CHO-GS. Продуктивность на 15 сут периодического культивирования с подпиткой двух групп составила до 2,5 г/л. Наблюдали увеличение удельной клеточной продуктивности продуцентов с использованием платформы CHO-GS. Вывод: применение линии CHO-GS, ауксотрофной по глутамину, более предпочтительно, т. к. сравнимый выход целевого белка достигается при более низкой концентрации жизнеспособных клеток, что благоприятно скажется в дальнейшем на этапах очистки и выделения целевого белка.

Ключевые слова: клетки яичника китайского хомяка, CHO, получение клеточных линий, ауксотрофия по глутамину, афлиберцепт

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: публикация подготовлена в рамках разработки лекарственного препарата афлиберцепт в АО «ГЕНЕРИУМ». публикация подготовлена в рамках разработки лекарственного препарата афлиберцепт в АО «ГЕНЕРИУМ».

Для цитирования: Тимонова С.С., Кирик И.А., Зарипова Д.Т., Фарсиева Р.И., Каргополов И.А., Анисимов Р.Л., Пискунов А.А., Хамитов Р.А. Сравнение продуцентов афлиберцепта, полученных на основе клеточных линий CHO и CHO-GS. *Биомедицина*. 2025;21(1):46–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-46-57>

Поступила 06.11.2024

Принята после доработки 15.02.2025

Опубликована 10.03.2025

COMPARISON OF AFLIBERCEPT PRODUCERS DERIVED FROM CHO AND CHO-GS CELL LINES

Sofya S. Timonova*, Inessa A. Kirik, Dolia T. Zaripova, Regina I. Farsieva,
Ivan A. Kargopolov, Roman L. Anisimov, Alexander A. Piskunov, Ravil A. Khamitov

GENERIUM

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

When creating cell lines expressing recombinant proteins, the type of selection marker and selection conditions are of essential importance. In this work, we aim to obtain and compare cell lines based on CHO and CHO-GS as potential aflibercept producers to identify the most suitable cell line for obtaining an aflibercept biosimilar. As a result, 10 monoclonal cell lines-producers of a potential aflibercept

biosimilar were obtained based on CHO and CHO-GS cell platforms. In the two groups, the productivity on the 15th day of periodic cultivation with feeding achieved 2.5 g/L. The CHO-GS group showed an increase in the specific cell productivity of aflibercept producers. The conclusion is made that the CHO-GS glutamine auxotroph line is a more preferable option. This cell line enables a comparable yield of target protein at lower concentrations of viable cells, which has a favorable effect on further stages of purification and isolation of target protein.

Keywords: Chinese hamster ovary cells, CHO, cell line development, glutamine auxotrophic line, aflibercept

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

Funding: this publication was prepared as part of the development of the drug aflibercept at GENERIUM JSC.

For citation: Timonova S.S., Kirik I.A., Zaripova D.T., Farsieva R.I., Kargopolov I.A., Anisimov R.L., Piskunov A.A., Khamitov R.A. Comparison of Aflibercept Producers Derived from CHO and CHO-GS Cell Lines. *Journal Biomed.* 2025;21(1):46–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-46-57>

Submitted 06.11.2024

Revised 15.02.2025

Published 10.03.2025

Введение

Тип селекционного маркера и условия селекции являются одними из ключевых факторов при получении продуцентов, экспрессирующих рекомбинантные белки. В биотехнологии для селекции продуцентов традиционно применяют экспрессионные векторы, содержащие гены, обеспечивающие клетке устойчивость к антибиотикам, например ген неомидин-фосфотрансферазы, который позволяет трансфицированной клетке расти в присутствии антибиотика неомидина.

Вместе с тем существует ряд проблем применения селекции на основе антибиотиков:

1) антибиотики могут изменять экспрессию гена клетки-хозяина, что может повлиять на продуктивность и/или качество продукции [14];

2) могут подавлять рост клеточной культуры и подавлять рост возможной контаминации во время разработки или производства препарата;

3) во время производства рекомбинантного белка использование антибиотика может затруднить последующую очистку и вызовет необходимость дополнительной стадии очистки от его остаточных количеств, что приведет к удорожанию процесса создания препарата в целом;

4) добавление селективного антибиотика в ростовую среду может привести к снижению высоких плотностей клеток и подавлению жизнеспособности культуры;

5) наличие гена устойчивости к антибиотикам может косвенно обусловить снижение количества экспрессируемого белка, поскольку даже в отсутствие селективного агента ген будет транскрибироваться, тем самым способствуя дополнительному стрессовому состоянию клетки во время процесса секреции целевого белка [13];

6) бесконтрольное потребление/применение антибиотиков приводит к появлению резистентности/полирезистентности и новых форм мутировавших бактериальных штаммов-контаминантов [7, 3].

По вышеуказанным причинам органы здравоохранения (FDA, EMEA, ВОЗ) уже рассматривают введение ограничений на использование антибиотиков во время разработки биофармпрепаратов даже на самых ранних этапах и рекомендуют сводить к минимуму их использование, постепенно переходя на новые системы селекции и контроля качества [12].

Таким образом, можно предположить, что в скором времени к биофармацевтической отрасли будут применены новые стандарты производства рекомбинантных белковых препаратов, а именно: генно-

инженерные конструкции должны быть полностью лишены генов устойчивости к антибиотикам в своей структуре. В связи с этим возникает задача по созданию клеточной линии, тип селекции которой не будет связан с антибиотикоустойчивостью [4].

Для соответствия современным требованиям и биобезопасности разработки лекарственных препаратов более рационально использовать систему селекции, основанную на механизмах ауксотрофии и маркерах метаболического пути клетки-хозяина (метаболическая селекция).

Одной из самых популярных мишеней для создания ауксотрофных клеточных линий является глутаминсинтетаза. Глутаминсинтетаза (GS, EC 6.3.1.2) представляет собой фермент, который играет важную роль в метаболизме клетки, катализируя образование глутамина из глутамата и аммиака.

Ранее использовали систему селекции, где продуцентов отбирают под действием L-метионинсульфоксима (MSX). MSX представляет собой низкомолекулярный необратимый ингибитор ферментативной активности GS. Клетки, трансфицированные экзогенным геном GS и геном интереса, культивируются в присутствии возрастающих доз MSX для ингибирования активности GS с целью отбора клонов, продуцирующих целевой белок. Увеличение доз MSX приводило к выживанию клеток, которые имели более высокое число интегрированных экспрессионных кассет, содержащих GS, включая ген интереса [10]. Из недостатков данной системы следует отметить увеличение сроков генерации клеточной линии с повышением содержания ингибирующего агента MSX, а также снижение продуктивности целевого белка при отмене давления MSX, что в совокупности будет приводить к нестабильности продуцентов в дальнейшем [5, 11].

Более перспективным приемом в разработке платформ для получения стабиль-

ных клеточных линий стало получение мутантов с подавлением экспрессии гена GS. Поскольку продуценты могут расти на среде без глутамина, это позитивно сказывается на всем процессе культивирования, поскольку снижается накопление в среде ионов аммония, которые могут быть токсичны для продуцентов [10].

Цель работы заключалась в получении клонов — продуцентов афлиберцепта с использованием двух клеточных линий: CHO и полученной в нашей лаборатории линии CHO-GS, ауксотрофной по глутамину, для сравнения ростовых и продукционных характеристик полученных клеточных культур для двух групп, а также исследование преимуществ использования клеточной линии CHO-GS.

Афлиберцепт представляет собой рекомбинантный гибридный белок, состоящий из фрагмента второго домена рецептора VEGFR1 и третьего домена рецептора VEGFR2, ковалентно связанных с Fc-фрагментом IgG1 человека. Рецептор VEGF обладает тирозинкиназной активностью и активируется сигнальным белком VEGF (от англ. Vascular endothelial growth factor — фактор роста эндотелия сосудов) [2]. Афлиберцепт действует как рецептор-ловушка для лигандов: фактора роста эндотелия сосудов-A (VEGF-A) и фактора роста сосудов плаценты (PlGF) за счет своего строения, тем самым предотвращая связывание этих лигандов с рецепторами эндотелия, VEGFR-1 и VEGFR-2. Строение белка обеспечивает его связывание с большинством факторов роста сосудов: VEGF-A, VEGF-B и PlGF, обеспечивая при этом локальное замедление и/или торможение роста сосудистой ткани. В конечном итоге действие препарата замедляет разрастание сосудов, что используется в офтальмологии для лечения неоваскулярной возрастной дегенерации желтого пятна [8], различных типов отека желтого пятна и диабетической ретинопатии

[9], а также дополнительно в качестве противоопухолевого препарата при различных формах раковых заболеваний [16].

Таким образом, создание отечественных высокотехнологичных препаратов рекомбинантных терапевтических белков, таких как афлиберцепт, на основе клеточной линии, аукоотрофной по глутамину CHO-GS, будет способствовать реализации государственной политики по развитию биофармацевтической отрасли в Российской Федерации и программы импортозамещения.

Материалы и методы

Клеточная линия CHO

Линия CHO-K1 (получена из НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИГенетика), далее — CHO была адаптирована к суспензионному культивированию в среде, не содержащей сыворотку или другие компоненты животного происхождения. Клетки CHO культивировали в среде BalanCD Growth A (“FUJIFILM IRVINE SCIENTIFIC INC”, США) при 37°C, 5% CO₂, влажности более 75% в CO₂-инкубаторе (“Sanyo”, Япония).

Клеточная линия CHO-GS

Адаптированные к бессывороточному культивированию клетки CHO-GS, аукоотрофные по глутамину, культивировали на среде BalanCD Growth A без использования L-глутамина при 37°C, 5% CO₂, влажности более 75% в CO₂-инкубаторе (“Sanyo”, Япония).

Дизайн Zn fingers и сборка плазмид для нокаута глутаминсинтетазы

Работа по сборке плазмид, кодирующих нуклеазы цинковых пальцев (ZFN, Zink Finger Nucleases) pFok+ex5, pFok-ex5, pFok+ex7, pFok-ex7 (табл. 1) для нокаута глутаминсинтетазы, проводилась аналогично протоколу, описанному в [6]. Для этого последовательности цинковых пальцев для внесения разрывов в 5 и 7 экзонах гена глутаминсинтетазы *C. griseus* были подобраны с помощью онлайн-ресурса <http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx>. Кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности Fok+/- (<https://www.addgene.org/browse/article/28244338/>) и Zn finger доменов были синтезированы TopGene Technologies (Канада). Последовательности Fok+ и Fok- (<https://www.addgene.org/browse/article/28244338/>) были клонированы в вектор pcDNA3.1 (Invitrogen) по сайтам NheI/ApaI, после чего в полученные конструкции по сайтам XbaI/BamHI были вставлены соответствующие домены цинковых пальцев.

Плотность жизнеспособных клеток, жизнеспособность культуры определяли с помощью автоматического счетчика клеток Countess II FL Automated Cell Counter (“Thermo Fisher Scientific”, США). Кумулятивную клеточную плотность (CCD) и удельную продуктивность (Qp) вычисляли по формулам, описанным в работе [1].

Нокаут гена GS (получение клеточной линии CHO-GS)

Клетки CHO были одновременно трансфицированы плазмидами pFok+ex5, pFok-ex5, pFok+ex7, pFok-ex7 с использованием электропоратора MaxCyte согласно протоколу производителя. Для подтверждения нокаута глутаминсинтетазы был проведен вестерн-блот клеточных лизатов с использованием антител к глутаминсинтетазе согласно протоколу, описанному в работе [15].

Экспрессионные векторы для CHO и CHO-GS, несущие ген белка афлиберцепта

Кодон-оптимизированная для экспрессии в CHO последовательность афлиберцепта, синтезированная TopGene Technologies (Канада), была клонирована в экспрессионные плазмиды с разными селективными маркерами: для CHO — ген устойчивости к пурамицину, для CHO-GS — ген глутаминсинтетазы (рис. 1).

Расчет ростовых характеристик клеточных культур

Плотность жизнеспособных клеток, жизнеспособность культуры определяли с помощью автоматического счетчика клеток Countess II FL Automated Cell Counter (“Thermo Fisher Scientific”, США). Кумулятивную клеточную плотность (CCD) и удельную продуктивность (Qp) вычисляли по формулам, описанным в работе [1].

Трансфекция клеток линии CHO методом электропорации

Клетки линии CHO были трансфицированы препаратами линейризованной плазми-

Таблица 1. Плазмиды, использованные для нокаута глутаминсинтетазы
Table 1. Plasmids used for glutamine synthetase knockout

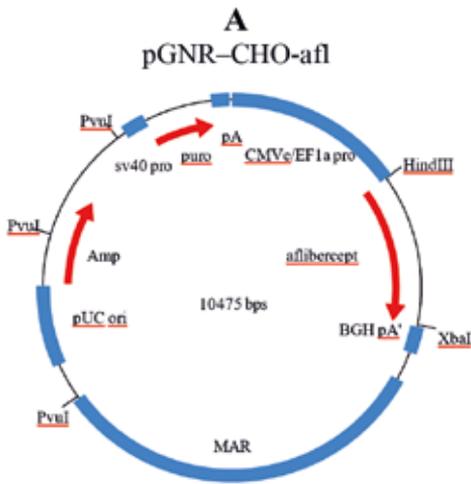
Плаزمида	Описание
pFok+ex5	Плазмида для экспрессии Fok+ нуклеазы цинковых пальцев, специфичной к последовательности 5-го экзона гена глутаминсинтетазы <i>S. griseus</i>
pFok-ex5	Плазмида для экспрессии Fok- нуклеазы цинковых пальцев, специфичной к последовательности 5-го экзона гена глутаминсинтетазы <i>S. griseus</i>
pFok+ex7	Плазмида для экспрессии Fok+ нуклеазы цинковых пальцев, специфичной к последовательности 7-го экзона гена глутаминсинтетазы <i>S. griseus</i>
pFok-ex7	Плазмида для экспрессии Fok- нуклеазы цинковых пальцев, специфичной к последовательности 7-го экзона гена глутаминсинтетазы <i>S. griseus</i>

ды, несущей ген афлиберцепта совместно с геном устойчивости к пуромицину (для трансфекции клеток линии CHO) или с геном глутаминсинтетазы (для трансфекции клеток линии CHO-GS). Перед трансфекцией определяли плотность жизнеспособных клеток и жизнеспособность культуры. Клетки ресуспендировали в буфере для электропорации. В клеточную суспензию вносили плазмидную ДНК и проводили

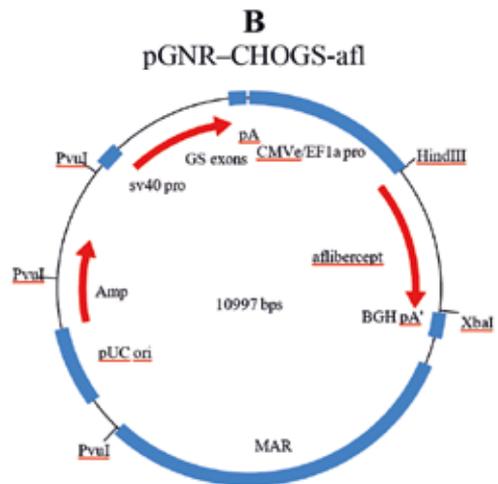
электропорацию клеток в камерах ОС-100 с использованием системы для трансфекции MaxCyte STX (“MaxCyte”, США) по инструкции производителя [1].

Получение минипулов

Трансфицированные клетки высевали в плоскостонные 96-луночные планшеты по 100 мкл/луночку в среде BCD с селективными агентами. Минипулы культивировали в стационарных условиях в течение 14 сут



Плазмида для экспрессии белка афлиберцепт под контролем гибридного CMVe/hEF1 промотора, содержащая эукариотический селективный маркер устойчивости к пуромицину (ген пуромицин N-ацетилтрансферазы *S. alboniger*)



Плазмида для экспрессии белка афлиберцепт под контролем гибридного CMVe/hEF1 промотора, содержащая эукариотический селективный маркер (ген глутаминсинтетазы *S. griseus*)

Рис. 1. Карты плазмид с геном афлиберцепта для линии CHO и CHO-GS.
Fig. 1. Plasmid maps with aflibercept gene for CHO and CHO-GS lines.

при 37°C, 5% CO₂ и влажности 70%. Затем проводили ряд скринингов по продуктивности минипулов методом ИФА.

Получение клонов-продуцентов

Клеточные пулы, экспрессирующие афлиберцепт, были клонированы в полутвердую среду ClonaCell Flex (“STEMCELL”, Канада) с посевной концентрацией 10 клеток/мл. Планшеты с растущими колониями клонов инкубировали 10 сут при 37°C, в условиях 5% CO₂, 70% влажности в CO₂-инкубаторе (“Sanyo”, Япония). Отбор клонов проводили с помощью роботизированной системы Clone Pix FL (“Molecular Devices”, США).

Иммуноферментный анализ

Для определения концентрации (продуктивности, мг/л) рекомбинантного афлиберцепта в культуральной жидкости (КЖ) проводили иммуноферментный анализ (ИФА) в 96-луночных планшетах Maxi-sorb Microplates (“Nunc”, Дания). Для сорбции использовали поликлональные козы антитела против иммуноглобулина человека (“Sigma”, Япония). В качестве детектирующих антител использовали поликлональные козы антитела против иммуноглобулина человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (“Sigma”, Япония). В качестве стандарта использовали референтный препарат афлиберцепт «EYLEA» (“Bayer”, Германия). Измерения проводили на спектрофотометре Benchmark Plus (“Bio-Rad Laboratories”, США) при OD-450.

Периодическое культивирование клеток с подпиткой

Культивирование клонов — продуцентов афлиберцепта проводили в биореакторах Ambr® 15 Cell Culture Bioreactor System (“Sartorius”, Германия). Посевная концентрация клеток составляла 0,3×10⁶ клеток/мл, в качестве добавки питательной среды использовали BalanCD CHO Feed 4 (“FUJIFILM IRVINE SCIENTIFIC INC”, США). Культивирование клонов проводили в условиях 5% CO₂ и 37°C при 800 об/мин на шейкере-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (“Kuhner”, Германия).

Определение уровня лактата и глюкозы

Для определения уровня лактата и глюкозы в культуральной жидкости использовали прибор Biosen C-line (“EKF — diagnostic GmbH”, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Хроматографическая очистка афлиберцепта

Хроматографическую очистку афлиберцепта проводили с использованием системы АКТА Purifier (“GE”, Швеция). В качестве аффинного сорбента использовали MabSelect SuRe. Культуральную жидкость, содержащую целевой белок, наносили на колонку, предварительно уравновешенную стартовым буфером (“Cytiva”, Швеция). По окончании нанесения сорбент последовательно промывали по 5 CV стартового и кондиционирующего (50 мМ ацетата натрия, pH=5,5) буферных р-ров. Белок элюировали р-ром, содержащим 50 мМ ацетата натрия, pH=3,8. По окончании первой стадии pH элюата доводили до 7,5 2 М р-ром Трис-буфера. Концентрацию белка определяли по оптическому поглощению при 280 нм, используя в качестве коэффициента экстинкции значение 1,16.

Статистический обчет результатов

Выполнен в программе Graph Pad Prism 6. Использовали однофакторный дисперсионный анализ one-way ANOVA test или t-критерий Стьюдента (unpaired t-test). P_{value} <0,0001 = ****, P_{value} <0,001 = ***, P_{value} <0,01 = **, P_{value} <0,05 = *, ns — нет статистической разницы, данные представлены в виде бокс-плотов.

Результаты исследований

Получение минипулов – продуцентов рекомбинантного афлиберцепта на основе клеточных платформ CHO и CHO-GS

Трансфекцию клеточных линий CHO и CHO-GS проводили методом электропорации на приборе MaxCyte STX. Для трансфекции использовали плазмиды pGNR–

Таблица 2. Жизнеспособность клеточных пулов после трансфекции
Table 2. Cell pool viability after transfection

Клеточная линия	Плазмиды	Время после трансфекции, ч			
		24	Жизне- способность, %	48	Жизне- способность, %
CHO	pGMR-CHO-af1	VCD, ×10 ⁶ клеток/мл 1,41	89	VCD, ×10 ⁶ клеток/мл 2,13	91
CHO-GS	pGMR-CHOGS-af1	1,16	94	1,96	92
CHO	Контроль	1,43	98	2,34	97
CHO-GS	Контроль	0,65	93	1,49	93

CHO-af1 и pGMR-CHOGS-af1 с целевым геном, кодирующим афлиберцепт (рис. 1).

Через 24 и 48 ч после электропорации определяли жизнеспособность и плотность жизнеспособных клеток трансфицированных пулов (табл. 2), после чего рассевали их на минипулы в селективные условия на двадцать 96-луночных планшетов для каждой линии. В случае клеточной платформы CHO в качестве селективного агента использовали антибиотик пурамицин; в случае клеточной платформы CHO-GS в качестве селективных условий использовали ростовую среду без добавления L-глутамина.

Далее проводили ряд скринингов с помощью ИФА, позволяющих выявить наиболее продуктивные линии клеток из двух групп (рис. 2).

В результате скрининга проб КЖ минипулов из 96-луночных планшетов, максимальная продуктивность линий на основе CHO составила около 40 мг/л, для продуцентов на основе CHO-GS — около 90 мг/л (рис. 2A) на 14-е сут стационарного культивирования. Лидерные 200 минипулов из каждой группы перенесли в больший объем селективной среды в 12-луночные планшеты, после чего культивировали при стационарных условиях и проводили ИФА. Максимальная продуктивность линий на основе CHO составила около 18 мг/л, для продуцентов на основе CHO-GS — около 32 мг/л (рис. 2B). Затем по 88 минипулов из каждой группы перенесли в больший объем селективной среды в 6-луночные планшеты и после стационарного культивирования провели анализ

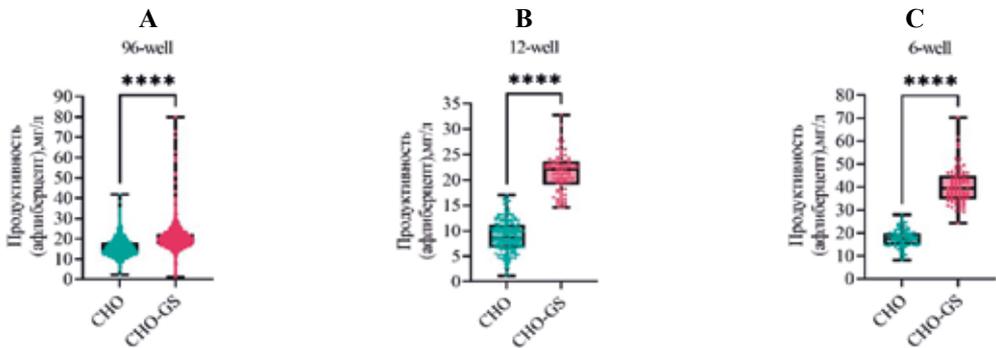


Рис. 2. Продуктивность минипулов на основе клеточных платформ CHO и CHO-GS во время проведения скрининга методом ИФА, мг/л: А — 96-луночных планшетов; В — 12-луночных планшетов; С — 6-луночных планшетов; CHO — клоны-продуценты афлиберцепта на основе линии CHO; CHO-GS — клоны-продуценты афлиберцепта на основе линии CHO-GS.

Fig. 2. Minipool productivity based on CHO and CHO-GS cell platforms during ELISA screening, mg/L: А — 96-well plates; В — 12-well plates; С — 6-well plates; CHO — aflibercept-producing clones based on CHO line; CHO-GS — aflibercept-producing clones based on CHO-GS line.

продуктивности минипулов; максимальная продуктивность линий в ходе скрининга в 6-луночных планшетах на основе CHO составила 30 мг/л, для продуцентов на основе CHO-GS — 70 мг/л (рис. 2С). По результатам последнего скрининга отобрали лидирующие минипулы из каждой группы для клонирования.

Получение клонов — продуцентов рекомбинантного афлиберцепта на основе клеточных платформ CHO и CHO-GS

Клоны-продуценты получали с помощью автоматизированной системы отбора колоний Clone Pix FL. Для каждой выборки были получены около 1000 клонов. Для определения наиболее продуктивных моноклональных клеточных линий проводили серию скринингов проб КЖ клонов методом ИФА (данные не приведены).

Лидерные клоны, по 10 из каждой группы, полученные после проведения серии скринингов, адаптировали к шейкерному культивированию, а затем культивировали 15 сут с подпиткой с использованием системы мини-биореакторов ambr™ 24 TAP Biosystems. Данная роботизированная система, прин-

цип работы которой описан в работе [14], предназначена для имитации условий промышленного биореактора в минимальных объемах 10–15 мл и позволяет спрогнозировать поведение культуры в условиях промышленного реакторного культивирования. В роботизированной системе во время процесса культивирования можно наблюдать уровень поступающих газов в мини-биореактор (CO₂ и O₂), pH и уровень растворенного кислорода в среде.

На рис. 3 отражены основные характеристики роста клонов — продуцентов афлиберцепта на основе CHO и CHO-GS в динамике. На рис. 4 представлены стандартные модели проведения культивирования в условиях мини-биореакторов ambr™ 24 TAP Biosystems.

Во время периодического культивирования в роботизированной системе (рис. 4) к 15-м сут жизнеспособность клонов составляла в среднем 65±15% на основе CHO и 73±10% на основе CHO-GS (рис. 3А); концентрация жизнеспособных клеток составляла (16,1±5,8)×10⁶ клеток/мл на основе CHO и (11,1±4,4)×10⁶ клеток/мл на основе

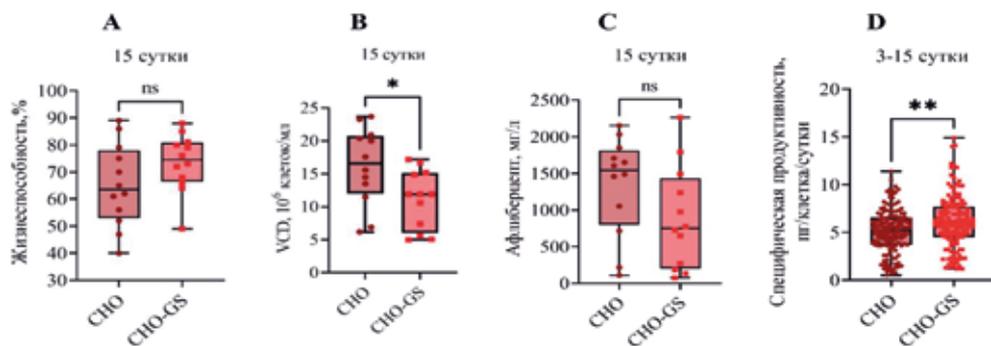


Рис. 3. Сравнение двух клеточных линий клонов-продуцентов афлиберцепта во время непрерывного культивирования: А — жизнеспособность клеток, %; В — плотность жизнеспособных клеток, VCD, ×10⁶ клеток/мл; С — волометрическая продуктивность на 15 сут культивирования, мг/л; D — удельная продуктивность клеток с 3 по 15 сут культивирования, (пг/(клетка×сут)). CHO — клоны-продуценты афлиберцепта на основе линии CHO; CHO-GS — клоны-продуценты афлиберцепта на основе линии CHO-GS.

Fig. 3. Comparison of two cell lines of afibercept-producing clones during continuous cultivation: A — cell viability, %; B — viable cell density, VCD, ×10⁶ cells/mL; C — volumetric productivity at 15 days of culturing, mg/L; D — specific cell productivity from 3 to 15 days of culturing, (pg/(cell×day)). CHO — afibercept-producing clones based on CHO line; CHO-GS — afibercept-producing clones based on CHO-GS line.

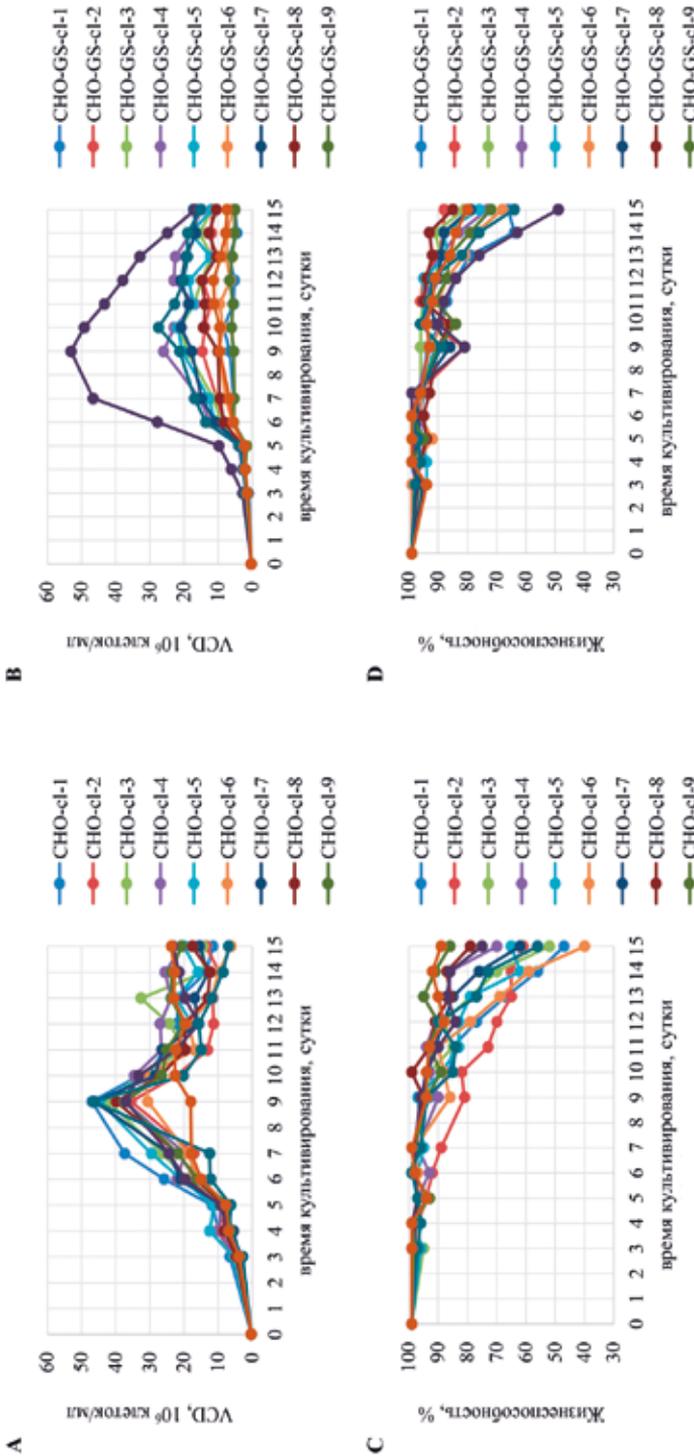


Рис. 4. Непрерывное культивирование с подпиткой клонов — продуцентов афлиберцета на двух клеточных линиях CHO и CHO-GS в течение 15 сут в системе мини-биореакторов ambTM 24 TAP Biosystems: A, B — плотность жизнеспособных клеток, $\times 10^6$ клеток/мл; C, D — жизнеспособность клеток; %, CHO-cl — клоны — продуценты афлиберцета, полученные на основе CHO; CHO-GS-cl — клоны — продуценты афлиберцета, полученные на основе CHO-GS, аутотрофной по глутамину.

Fig. 4. Continuous cultivation with feeding of afibercept-producing clones on two cell lines CHO and CHO-GS for 15 days in ambTM 24 TAP Biosystems mini-bioreactor system: A, B — density of viable cells, $\times 10^6$ cells/mL; C, D — cell viability, %; CHO-cl — clones — afibercept-producing clones derived from CHO; CHO-GS-cl — afibercept-producing clones derived from glutamine auxotrophic CHO-GS.

CHO-GS (рис. 3В); концентрация целевого рекомбинантного белка клонов составляла $1,33 \pm 0,67$ г/л на основе CHO и $0,88 \pm 0,70$ г/л на основе CHO-GS (рис. 3С); удельная продуктивность клеток за все время процесса (с 3 по 15 сут) составляла $5,20 \pm 2,27$ пг/клетка/сут на основе CHO и $6,10 \pm 2,75$ пг/клетка/сут на основе CHO-GS (рис. 3D).

Несмотря на более высокую концентрацию целевого рекомбинантного белка на основе CHO, для промышленного использования был выбран клон, обладающий наибольшей удельной продуктивностью на основе CHO-GS.

На рис. 4 представлены результаты измерения профиля гликозилирования после выделения полученного белка и его очистки. Важно отметить, что полученный профиль гликозилирования сравним с референтным препаратом «Эйлея» (рис. 5).

Обсуждение результатов

При разработке продуцентов рекомбинантного афлиберцепта с использованием двух родительских линий лидирующую по-

зицию по продуктивности занимала клеточная линия CHO-GS (рис. 2).

При культивировании с подпиткой в минибиореакторах наблюдали сравнимую для двух групп жизнеспособность культуры (рис. 3А) и волнометрическую продуктивность целевого белка (рис. 3С), однако вместе с тем наблюдали статистически подтвержденную разницу плотности жизнеспособных клеток двух групп (рис. 3В). Также выявили, что удельная продуктивность клеток на основе CHO-GS выше: $6,10 \pm 2,75$ вместо $5,20 \pm 2,27$ пг/клетка/сут на основе CHO (рис. 3D), данный параметр количественно определяет скорость экспрессии белка в единицу времени и является, на наш взгляд, ключевым. Удельная продуктивность клеточных линий зависит от двух показателей: содержания (титра) белка (г/л) и концентрации жизнеспособных клеток. Соответственно, можно сделать вывод о том, что полученная клеточная линия CHO-GS более привлекательна для получения промышленных продуцентов при прочих равных условиях, экспрессируя сравнимое количество белка, а также имеет более

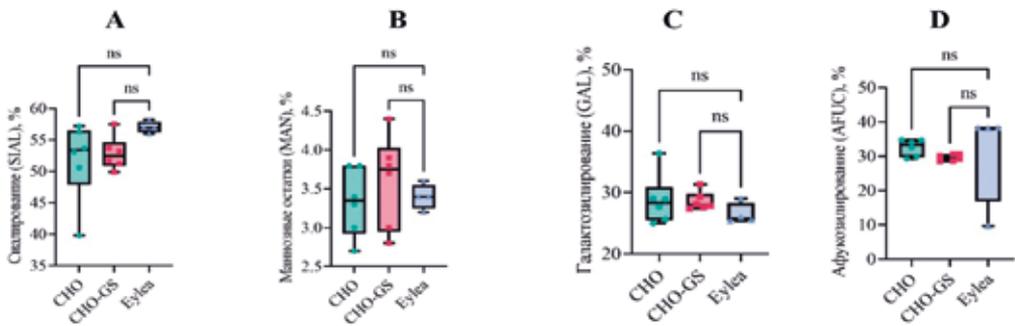


Рис. 5. Содержание основных гликанов (%), характерных для полученного рекомбинантного афлиберцепта, в сравнении с референтным препаратом Эйлея: А — сиалированные гликаны; В — маннозные остатки; С — галактозилированные гликаны; D — афукозилированные гликаны. CHO — клоны — продуценты афлиберцепта на основе линии CHO; CHO-GS — клоны — продуценты афлиберцепта на основе линии CHO-GS.

Fig. 5. Content of basic glycans (%) characteristic of the obtained recombinant aflibercept in comparison with the reference drug Eylea: A — sialylated glycans; B — mannose residues; C — galactosylated glycans; D — afucosylated glycans. CHO — aflibercept-producing clones based on CHO line; CHO-GS — aflibercept-producing clones based on CHO-GS line.

низкую плотность жизнеспособных клеток, что, в свою очередь, благоприятно влияет на последующие стадии очистки препарата (очистка белка, очистка препарата от белков клеток-хозяина, в нашем случае — белков CHO, и пр.). При этом увеличение скорости образования продукта (удельная продуктивность) у продуцентов группы CHO-GS не повлияло на снижение качества посттрансляционных модификаций рекомбинантного белка, в т. ч. профиля гликозилирования (рис. 5). По результатам, представленным на рис. 5, видно, что при сравнении ключевых показателей гликозилирования афлиберцепта, полученного на основе CHO и CHO-GS, и референтного препарата статистически значимых отличий не выявлено.

Закключение и выводы

1. Получены моноклональные клеточные линии — продуценты рекомбинантного белка афлиберцепт на основе двух клеточных линий CHO и CHO-GS.
2. Сравнение двух клеточных линий CHO и CHO-GS от начала разработки до получения финальных клонов-продуцентов показало преимущество использования клеточной линии CHO-GS по показателю удельной продуктивности, качеству продукта, что, по видимому, обусловлено особенностями ее селекции по метаболическому маркеру.
3. По результатам проведенного исследования считаем, что для получения рекомбинантных белков терапевтического назначения целесообразнее использовать линию CHO-GS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Тимонова С.С., Павелко В.И., Кирик И.А., Бадэ В.Н., Малыгина Т.О., Хамитов Р.А., Пискунов А.А. Принцип оперативного выбора лидерных клонов-продуцентов моноклональных антител при создании стабильных клеточных линий на основе CHO. *Биотехнология*. 2019;35(4):65–72. [Timonova S.S., Pavelko V.I., Kirik I.A., Bade V.N., Malygina T.O., Khamitov R.A., Piskunov A.A. Principle of operative selection of leading clones of monoclonal antibodies in the development of stable CHO-based cell lines]. *Biotechnology*. 2019;35(4):65–72 (In Russian). DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-65-72.
2. Adams B.S., Sorhaitz W., Stringham J. Afibercept. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC, 2025.
3. Cheng G., Ning J., Ahmed S., Huang J., Ullah R., An B., Hao H., Dai M., Huang L., Wang X., Yuan Z. Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:158.
4. Dong W.R., Xiang L.X., Shao J.Z. Novel antibiotic-free plasmid selection system based on complementation of host auxotrophy in the NAD de novo synthesis pathway. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(7):2295–2303.
5. Fann C.H., Guirgis F., Chen G., Lao M.S., Piret J.M. Limitations to the amplification and stability of human tissue-type plasminogen activator expression by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*. 2000;69(2):204–212.
6. Foley J.E., Maeder M.L., Pearlberg J., Joung J.K., Peterson R.T., Yeh J.R. Targeted mutagenesis in zebrafish using customized zinc-finger nucleases. *Nat. Protoc*. 2009;4(12):1855–1867.
7. Klümper U., Recker M., Zhang L., Yin X., Zhang T., Buckling A., Gaze W.H. Selection for antimicrobial resistance is reduced when embedded in a natural microbial community. *ISME J*. 2019;13(12):2927–2937.
8. Lanzetta P., Korobelnik J.F., Heier J.S., Leal S., Holz F.G., Clark W.L., Eichenbaum D., Iida T., Xiaodong S., Berliner A.J., Schulze A., Schmelter T., Schmidt-Ott U., Zhang X., Vitti R., Chu K.W., Reed K., Rao R., Bhore R., Cheng Y., Sun W., Hirshberg B., Yancopoulos G.D., Wong T.Y., PULSAR Investigators. Intravitreal aflibercept 8 mg in neovascular age-related macular degeneration (PULSAR): 48-week results from a randomised, double-masked, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet*. 2024;403(10432):1141–1152.
9. Liberski S., Wichrowska M., Kocięcki J. Afibercept versus Faricimab in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration and Diabetic Macular Edema: A Review. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23(16):9424.
10. Lin P.C., Chan K.F., Kiess I.A., Tan J., Shahreel W., Wong S.Y., Song Z. Attenuated glutamine synthetase as a selection marker in CHO cells to efficiently isolate highly productive stable cells for the production of antibodies and other biologics. *MABS*. 2019;11(5):965–976.
11. Pallavicini M.G., DeTeresa P.S., Rosette C., Gray J.W., Wurm F.M. Effects of methotrexate on transfected DNA stability in mammalian cells. *Mol. Cell Biol*. 1990;10(1):401–404.
12. Pana M., ed. Antibiotic resistant bacteria: A continuous challenge in the new millennium. Rijeka, Croatia: InTech, 2012:531–548.

13. Peubez I., Chaudet N., Mignon C., Hild G., Husson S., Courtois V., De Luca K., Speck D., Sodoyer R. Antibiotic-free selection in *E. coli*: new considerations for optimal design and improved production. *Microb Cell Fact.* 2010;9:65.
14. Ryu A.H., Eckalbar W.L., Kreimer A., Yosef N., Ahituv N. Use antibiotics in cell culture with caution: genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Sci Rep.* 2017;7(1):7533.
15. Santiago Y., Chan E., Liu P.Q., Orlando S., Zhang L., Urnov F.D., Holmes M.C., Guschin D., Waite A., Miller J.C., Rebar E.J., Gregory P.D., Klug A., Collingwood T.N. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(15):5809–5814.
16. Yildirim M.E., Karadurmuş N., Ökten İ.N., Türk H.M., Uraççı Z., Arslan Ç., Çelik S., Dane F., Şendur M.A.N., Bilir C., Karabulut B., Cicin İ., Çubukçu E., Karaca M., Özcelik M., Artaç M., Tanrikulu E., Alacacioglu A., Açıköz Ö., Öven B., Geredeli Ç., Çil T., Harputluoğlu H., Kefeli U., Bozkurt O., Tural D., Sakin A., Yalçın Ş., Gumus M. Real-world treatment outcomes from nationwide Onco-colon Turkey registry in RAS wild-type patients treated with biologics second-line mCRC. *J. Oncol. Pharm. Pract.* 2024;10781552241241004.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тимонова Софья Сергеевна*, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: timonova1993@yandex.ru

Sofya S. Timonova*, GENERIUM;
e-mail: timonova1993@yandex.ru

Кирик Инесса Анатольевна, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: Kirik@ibcgenerium.ru

Inessa A. Kirik, GENERIUM;
e-mail: Kirik@ibcgenerium.ru

Зарипова Долия Тагировна, АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: zaripova@ibcgenerium.ru

Dolia T. Zaripova, GENERIUM;
e-mail: zaripova@ibcgenerium.ru

Фарсиева Регина Ильгизовна, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: farsieva@ibcgenerium.ru

Regina I. Farsieva, GENERIUM;
e-mail: farsieva@ibcgenerium.ru

Каргополов Иван Андреевич, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: kargopolov96@mail.ru

Ivan A. Kargopolov, GENERIUM;
e-mail: kargopolov96@mail.ru

Анисимов Роман Львович, АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: Anisimov@ibcgenerium.ru

Roman L. Anisimov, GENERIUM;
e-mail: Anisimov@ibcgenerium.ru

Пискунов Александр Александрович, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: Piskunov@ibcgenerium.ru

Alexander A. Piskunov, GENERIUM;
e-mail: Piskunov@ibcgenerium.ru

Хамитов Равиль Авгатович, АО «ГЕНЕ-РИУМ»;
e-mail: Khamitov@ibcgenerium.ru

Ravil A. Khamitov, GENERIUM;
e-mail: Khamitov@ibcgenerium.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author



ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНОБОГАЩЕННОЙ ЛАМИНАРИИ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ СПЕРМАТОГЕНЕЗА КРЫС НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ПАТОСПЕРМИИ

Н.Э. Струппуль^{1,*}, В.Е. Силантьев^{1,2}, Т.Г. Боровская³,
Н.В. Пучкова⁴, Е.Л. Соболева¹

¹ ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Школа медицины и наук о жизни
690922, Российская Федерация, Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10

² ФГБун «Институт химии» ДВО РАН
690022, Российская Федерация, Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159

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

⁴ «Приморский океанариум» — филиал ННЦ морской биологии ДВО РАН
690017, Российская Федерация, Владивосток, о. Русский, ул. Академика Касьянова, 25

Работа посвящена проблемам репродуктивного мужского здоровья, вызываемым патозооспермией, которая сопровождается снижением количества и подвижности сперматозоидов. Причиной патологии во многих случаях становится окислительный стресс. Известно, что морские водоросли повышают устойчивость клеток. Перспективным решением является использование селенобогатенных бурых водорослей. Целью работы является доклиническое исследование эффективности биологически активной добавки, изготовленной на основе селенизированных бурых водорослей, на модели патозоспермии (олиго- и астеноспермии) крыс. Патозоспермию вызывали внутривенным введением этопозида. За 5 дней до и после введения этопозида животным внутривенно вводили исследуемый препарат из расчета 10 мкг Se на 100 г массы животного и препарат сравнения — ламинарию, не обогащенную селеном. Введение препарата оказалось эффективным средством снижения степени выраженности олигоспермии. Общее число сперматозоидов у крыс, получавших селенообогащенную ламинарию, возрастало на 41,2%, но процент подвижных форм оставался на уровне контрольных значений и не превышал 65%. Показано достоверное снижение количества свободных радикалов и возрастание антиоксидантной активности по сравнению с контролем (на 33 и 20% соответственно). Отмечена нормализация окислительно-восстановительного баланса клеток тестикулярной ткани до фоновых значений. У крыс, получавших необогащенную ламинарию, было отмечено существенное увеличение процента подвижных форм сперматозоидов (на 36%) и снижение количества свободных радикалов на 38,6%, хотя окислительно-восстановительный баланс в клетках тестикулярной ткани крыс этой группы не восстанавливался. Показано, что антирадикальный эффект имеет большее значение для восстановления подвижности клеток, чем нормализация редокс-потенциала. Таким образом, в модели патозоспермии (олигоспермия, астеноспермия) биологически активная добавка на основе селенобогатенных бурых водорослей *Saccharina japonica* оказалась эффективным средством, стимулирующим продуктивность сперматогенеза.

Ключевые слова: Se-обогащенная ламинария, *Saccharina japonica*; сперматогенез, прооксидантно-антиоксидантный баланс

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках реализации проекта «Науки о жизни: Биомедицина» программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030», инициативная тематика № 24-01-3.04-0003 «Биофармацевтические технологии для персонализированной медицины»

и здоровье сбережения» с использованием оборудования ЦКП «Приморский океанариум», ННЦМБ ДВО РАН (г. Владивосток) и оборудования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск).

Для цитирования: Струппуль Н.Э., Силантьев В.Е., Боровская Н.Г., Пучкова Н.В., Соболева Е.Л. Влияние селенобогатенной ламинарии на продуктивность сперматогенеза крыс на фоне экспериментальной модели патоспермии. *Биомедицина*. 2025;21(1):58–68. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-58-68>

Поступила 01.10.2024

Принята после доработки 05.12.2024

Опубликована 10.03.2025

EFFECT OF SELEN-ENRICHED LAMINARIA ON RAT SPERMATOGENESIS IN MODELED PATHOSPERMIA

Nadezhda E. Struppul^{1,*}, Vladimir E. Silant'ev^{1,2}, Tatyana G. Borovskaya³,
Natalia V. Puchkova⁴, Ekaterina L. Soboleva¹

¹ School of Medicine and Life Sciences of the Far Eastern Federal University
690922, Russian Federation, Vladivostok, Russky Island, Ajax Bay, 10

² Institute of Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences
690022, Russian Federation, Vladivostok, 100-letiya Vladivostoka Ave., 159

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

⁴ «Primorsky Aquarium» — Branch of the National Scientific Center of Marine Biology
of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Science
690922, Russian Federation, Vladivostok, Russky Island, Academician Kasyanova Str., 25

This work addresses the issues of male reproductive health caused by pathozoospermia, which leads to a decrease in the number and motility of sperm cells. In many cases, this pathology is associated with oxidative stress. Seaweed is known to increase cellular resistance, making selenium-enriched brown algae (*Saccharina japonica*) a promising research object. In this paper, we report a preclinical study into the efficacy of a biologically active supplement obtained from selenium-enriched brown algae using modeled pathospermia (oligo- and asthenospermia) in rats. Pathospermia was induced by an intravenous administration of etoposide. Five days before and after etoposide administration, the animals were intragastrically administered the supplement under study in the amount of 10 µg Se per 100 g of animal weight. Laminaria not enriched with selenium was used as a reference preparation. The supplement under study proved to be effective in reducing the severity of oligospermia. The total number of sperm cells in rats receiving selenium-enriched laminaria increased by 41.2%; however, the share of motile forms remained at the level of control values, not exceeding 65%. The study revealed a significant decrease in the number of free radicals and an increase in antioxidant activity compared to the control (by 33 and 20%, respectively). A normalization of the redox balance of testicular tissue cells against the background values was noted. In rats receiving the control preparation, a significant increase in the share of motile forms of sperm cells (by 36%) and a decrease in the number of free radicals by 38.6% were observed, although the redox balance of testicular tissue cells was not restored. The antiradical effect was shown to be a more important factor in the restoration of cell motility than the normalization of the redox potential. Therefore, the studied biologically active supplement based on selenium-enriched brown algae (*Saccharina japonica*) proved effective in stimulating spermatogenesis in modeled pathospermia (oligospermia, asthenospermia).

Keywords: Se-enriched laminaria, *Saccharina japonica*, spermatogenesis; prooxidant-antioxidant balance

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

Funding: the study reported in this publication was carried out as part of Project “Life Sciences: Biomedicine”, Strategic Academic Leadership Program “Priority-2030”, initiative theme No. 24-01-3.04-0010 “Biopharmaceutical technologies for personalized medicine and healthcare”, using the equipment of the Primorsky Aquarium Shared Equipment Facility of the A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences (NSCMB FEB RAS) (Vladivostok) and the equipment of the Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (Tomsk).

For citation: Struppul N.E., Silant’ev V.E., Borovskaya T.G., Puchkova N.V., Soboleva E.L. Effect of Selen-Enriched Laminaria on Rat Spermatogenesis in Modeled Pathospermia. *Journal Biomed.* 2025;21(1):58–68. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-58-68>

Submitted 01.10.2024

Revised 05.12.2024

Published 10.03.2025

Введение

Проблема репродуктивного здоровья мужского населения приобрела в последние годы не только медицинское, но и социальное значение [5]. За последние 50 лет продуктивность сперматогенеза мужчин в целом снизилась на 2 млн клеток [19]. Причиной патологии в половине случаев является патозооспермия, при которой в эякуляте наблюдаются различные отклонения от нормальных показателей спермограммы, в т.ч. низкая подвижность сперматозоидов (астенозооспермия) и снижение их количества (олигозооспермия).

Важную роль в патогенезе олиго-астеноспермии играет окислительный стресс — повреждение клеток сперматозоидов при переизбытке активных форм кислорода [7, 16]. Это связано с тем, что мембраны сперматозоидов содержат большое количество полиненасыщенных жирных кислот, а их цитоплазма обладает невысокой антиоксидантной активностью. В связи с этим зрелые мужские половые клетки очень чувствительны к воздействию окислителей [25]. Известно, что морские водоросли повышают устойчивость клеток к окислительному стрессу и активно используются в производстве фармацевтических препаратов [17, 24].

Важную роль в процессах сперматогенеза играют микроэлементы. Результаты многих исследований подтверждают зна-

чительное влияние селена на репродуктивную функцию [12, 22]. Селен в составе селенистеина входит в активный центр глутатионпероксидазы — основного фермента внутриклеточной антиоксидантной системы, являясь ключевым фактором активности антиоксидантной защиты. Показано, что этот микроэлемент обеспечивает защиту сперматозоидов от активных форм кислорода [21]. Перспективным решением является увеличение активности морских бурых водорослей путем обогащения их селеном.

Цель работы — доклиническое изучение эффективности новой биологически активной добавки на основе селенобогащенной ламинарии на модели патозоспермии (олиго- и астеноспермии) крыс.

Материалы и методы

Объектом исследования являлась биологически активная добавка к пище, изготовленная на основе селенизированных бурых водорослей *Saccharina japonica*. В России этот вид известен под названием морская капуста и под устаревшим названием ламинария японская, т.к. ранее, до 2006 г., относился к роду Ламинария (*Laminaria*) [18].

Обогащение талломов ламинарии селеном проводили по разработанному ранее методу [10]. Водоросли помещали в емкость

с морской водой, вносили р-р селенита натрия из расчета 0,5 мг Se/л и выдерживали в течение 10 сут при постоянной аэрации. Среда обновлялась ежедневно, соотношение массы водорослей и объема воды составляло 1:20. Обогащенное водорослевое сырье сушили в контролируемых условиях, измельчали и стандартизировали по селену до концентрации 50 ± 2 мкг/г сухой массы. Контроль селена производили микрофлуориметрическим методом с 2,3-диаминонафталином (CAS 771-97-1, "Acros Organics", Бельгия) [6]. Стандартизированную селенобогатенную ламинарию использовали для производства биологически активной добавки (СРР № АМ.01.08.01.003. R.000290.10.23). В качестве препарата сравнения использовали биомассу *S. japonica*, не обогащенную селеном, высушенную в аналогичных условиях. Содержание селена в исходном водорослевом сырье составляло $1,8 \pm 0,3$ мкг/г сухой массы.

Влияние селенизированной ламинарии на состояние репродуктивной системы половозрелых лабораторных крыс изучали на модели патоспермии, вызванной введением этопозиды [1]. Этопозид является синтетическим производным подофиллотоксинов, выделенных из подофилла щитовидного (*Podophyllum peltatum L.*), используемым в медицинской практике в качестве противоопухолевого средства.

Механизм действия этопозиды заключается в ингибировании топоизомеразы II путем воздействия на пространственную структуру фермента, что приводит к нарушению процесса репликации ДНК [11]. При этом препарат является не только ингибитором топоизомеразной активности, но и прооксидантом вследствие накопления свободных радикалов, образующихся в процессе его метаболизма [15]. Введение этопозиды сопровождается возникновением и накоплением патологических форм сперматозоидов, снижением их функциональной активности и нару-

шением генеративной функции семенников. Результатом является развитие патоспермии и нарушение репродуктивных функций организма [2, 9, 15].

Работа проведена с участием животных из питомника отдела экспериментального биомедицинского моделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, г. Томск. Были использованы следующие критерии включения: клинически здоровые половозрелые крысы-самцы линии SD (Sprague Dawley); возраст 12 недель; масса 250–400 г.

Исследование проводили с использованием 28 животных — количество, достаточное для полной регистрации изучаемых эффектов. Исследование одобрено локальным этическим комитетом по биоэтике при НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (код исследования 213092023). Содержание крыс осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, применяемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014 и др. [3, 4, 13, 14]. Период адаптации от приема до использования животных в исследовании составил 10 сут. Здоровье животных при включении в эксперимент подтверждалось ветеринарным врачом.

Животные были рандомизированы в четыре группы по 7 особей в каждой. Масса тела каждого животного в группе имела отклонение от среднего значения не более 10%. Каждому животному в клетке присваивался индивидуальный номер. Идентификация осуществлялась цветовой меткой на теле красителем фукурцином.

Этопозид (etoposide, этопозид, Teva, Израиль, МПД 30 мг/кг) вводили животным внутривенно однократно в дозе 30 мг/кг. За 5 дней до и после введения этопозиды животным экспериментальных групп внутрижелудочно вводили исследуемый препарат (экспериментальная группа «Селен») и препарат сравнения —

ламинарию, не обогащенную селеном (экспериментальная группа «Ламинария»). Препараты использовались в виде суспензии на основе 1 %-го крахмального геля. Дозы препарата рассчитаны для каждого животного индивидуально исходя из массы тела. Масса селенизированной ламинарии рассчитывалась из расчета 10 мкг Se на 100 г массы животного, что соответствовало 0,2 г БАД. Масса препарата сравнения — 0,2 г порошка ламинарии на 100 г массы животного. Объемы для внутрижелудочного введения (5–6 мл) не превышали максимально допустимого для данного вида животных. Наблюдение за животными осуществлялось в течение всего периода введения. Клинический осмотр проводился один раз в день, индивидуально по каждому животному, и включал визу-

альный осмотр в клетке без применения дополнительных инструментальных методов. Дозы для введения рассчитывали на основании последних данных массы тела животных. Взвешивание проводили один раз в неделю.

Исследуемые группы сравнивали попарно: фон с контрольной группой; контрольную группу — с животными, получавшими селенизированную ламинарию; контрольную группу — с крысами, которым вводили только ламинарию (рис. 1).

Самцов подвергали эвтаназии на 11-е сут после окончания введения исследуемых веществ с использованием CO₂-камеры. Выделяли семенник и хвостовую часть придатка семенника. Семенник помещали в физ. р-р для дальнейшего исследования уровня свободных радикалов, анти-

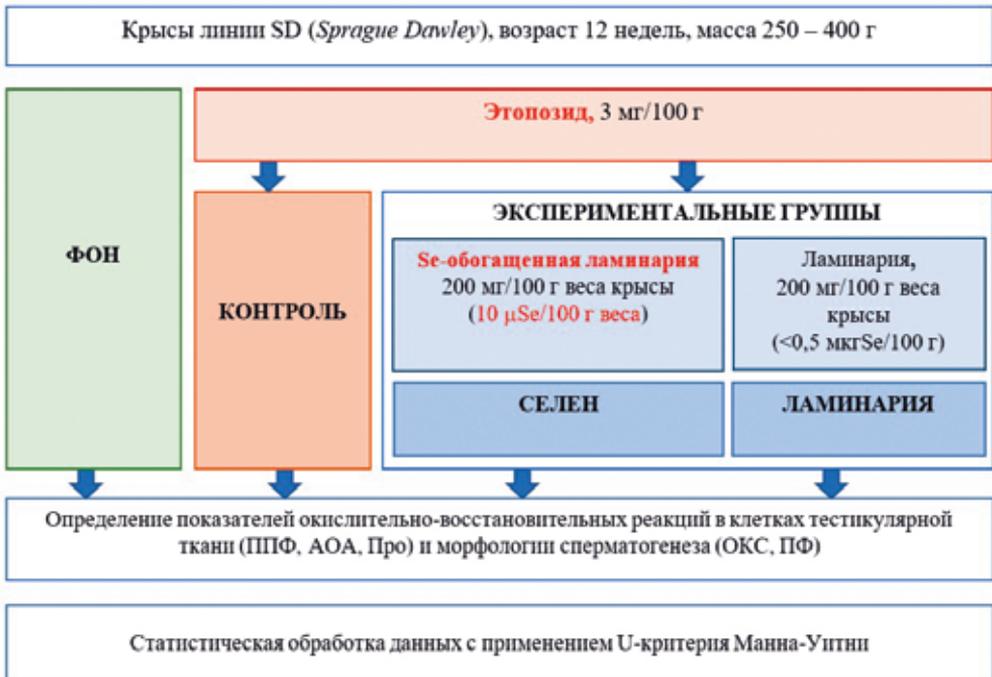


Рис. 1. Полная схема исследования эффективности селенобогащенной ламинарии на модели патоспермии лабораторных крыс.

Fig. 1. Research design of a study into the efficacy of selen-enriched laminaria in modeled of pathospermia in laboratory rats.

оксидантной активности, сперматозоиды хвостовой части семенника использовали для определения общего количества половых клеток (ОКС) и процента подвижных форм (ППФ).

Подсчет ОКС и ППФ производили согласно методическим рекомендациям по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств [8] с использованием камеры Горяева и микроскопа «Микмед-6» (ОАО «Ломо», ув. $\times 600$).

Антиоксидантную активность (АОА) и прооксидантную активность (Про) гомогенатов ткани определяли методом хемилюминесценции [20] с помощью цветного биолуминометра Lumat LB9507 (“Berthold Technologies”, Германия), работающего в режиме счета фотонов, время экспозиции 0,1 с.

Количественную величину Про и АОА выражали в (RLU/мл)/сек, где RLU — относительная единица света relative light units = 10 фотонам. Окислительно-восстановительный баланс (ОВБ, уровень окислительного стресса) тканевых гомогенатов рассчитывали как отношение величины светосуммы АОА к светосумме Про [20].

Измеряемые и расчетные показатели представлены в виде среднего и ошибки среднего с указанием достоверности различий между сравниваемыми группами по изучаемым показателям. Статистическая обработка результатов проводилась с применением U-критерия Манна—Уитни. Уровень значимости $p < 0,05$ [23].

Результаты и их обсуждение

Введение этопозида крысам-самцам инициировало у них появление признаков олигоспермии (снижение общего количества половых клеток) и астеноспермии (снижение подвижности спермиев). ОКС интактных крыс составило $78,7 \pm 10,7$ млн, ППФ спермиев находился в пределах 80% от общего количества сперматозоидов (рис. 2). В контрольной группе крыс, получавших этопозид, продуктивность сперматогене-

за снижалась до 55,6%, а ППФ — до 77% от фоновых значений ($p < 0,05\%$). Таким образом, разница ОКС и ППФ между контрольной и интактной группами составляла 44,4 и 18,25% соответственно.

Результаты показали, что введение селенобогатенной ламинарии оказалось эффективным средством снижения степени выраженности олигоспермии. Общее количество половых клеток у крыс, получавших этопозид в сочетании с препаратом селенобогатенной ламинарии, статистически значимо возрастало на 41,2% по сравнению с контролем. Однако процент подвижных форм у крыс этой группы оставался на уровне контрольных значений и не превышал 65% (табл. 1).

Введение ламинарии, не обогащенной селеном, не повлияло на продуктивность сперматогенеза, но приводило к возрастанию процента подвижных форм сперматозоидов. Этот показатель статистически значимо возрастал относительно контроля на 36%, достигая верхних границ фоновых значений.

Литературные данные подтверждают тот факт, что селен способствует подвижности сперматозоидов [12, 21, 22], однако при этом большое значение имеет его концентрация. Имеются данные о том, что избыток селена так же, как и его дефицит, отрицательно влияет на развитие яичек и сперматогенез, в то время как основные механизмы в этом отношении остаются неясными [26]. В связи с этим нельзя исключить, что отсутствие положительного действия селенобогатенной ламинарии на процент подвижных форм спермиев может быть обусловлено высокой концентрацией селена в клетках тестикулярной ткани.

Оценка уровня антиоксидантной активности, активных форм кислорода и ОВБ показала, что введение этопозида животным контрольной и экспериментальных групп привело к развитию окислительного стресса. Уровень АОА в клетках тестикулярной ткани у крыс, получавших этопозид, был

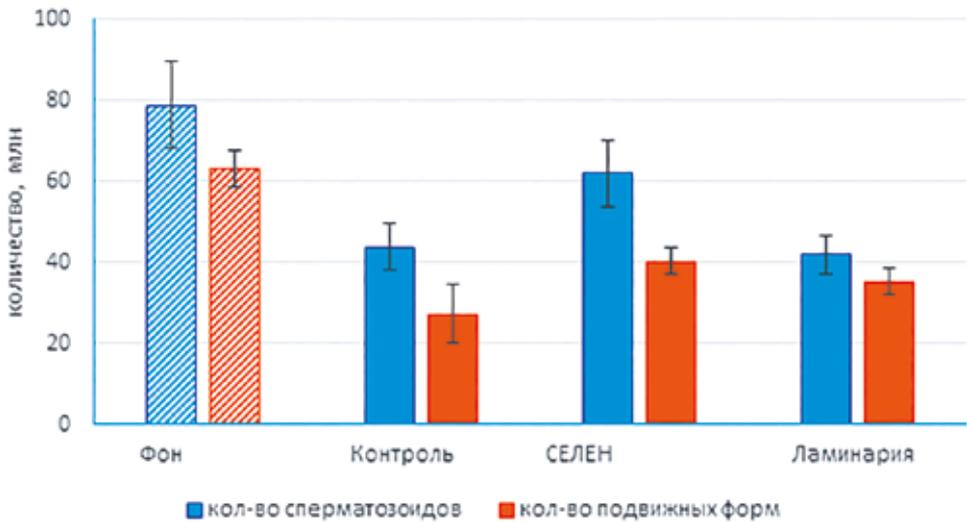


Рис. 2. Продуктивность сперматогенеза крыс на фоне сочетанного введения этопозида и селенобогатой ламинарии. * — отличия статистически значимы с фоном, $p < 0,05$ (U-критерий Манна—Уитни). # — отличия статистически значимы с группой контроля, $p < 0,05$ (U-критерий Манна—Уитни).

Fig. 2. Productivity of spermatogenesis in rats under the action of combined administration of etoposide and selen-enriched laminaria. * — statistically significant differences from the background values, $p < 0.05$ (Mann–Whitney U-test). # — statistically significant differences from the corresponding control group, $p < 0.05$ (Mann–Whitney U-test).

Таблица 1. Влияние селенобогатой ламинарии на процент подвижных форм сперматозоидов при патоспермии

Table 1. Effect of selen-enriched laminaria on the share of motile sperm forms in pathospermia

Группа животных (n=7)	Количество подвижных форм сперматозоидов, %
Фон	80,06±4,31
Контроль	61,81±7,25*
Селен	64,92±3,28
Ламинария	84,28±3,39#

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с фоном при $p < 0,05$;

— различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Note: * — statistically significant differences from the background values, $p < 0.05$ (Mann–Whitney U-test). # — statistically significant differences from the control group, $p < 0.05$ (Mann–Whitney U-test).

снижен на 66,1%, а уровень свободных радикалов увеличился на 25,4% от фоновых значений интактных животных. ОВБ составил 52% от фоновых значений (табл. 2).

Группа животных, принимавших селенобогатую ламинарию, показала статистически значимое снижение количества свободных радикалов и возрастание

показателя АОА по сравнению с контролем (на 33% и на 20% соответственно). Также отмечена нормализация окислительно-восстановительного баланса клеток тестикулярной ткани. У крыс, получавших селенобогатую ламинарию, этот показатель возрастал в 1,8 раза по сравнению с кон-

Таблица 2. Влияние сочетанного введения этопозида и селенобогатенной ламинарии на показатели окислительно-восстановительных реакций в клетках тестикулярной ткани

Table 2. Effect of combined administration of etoposide and selen-enriched laminaria on the indicators of redox reactions in testicular tissue cells

Группа животных (n=7)	АОА, (RLU/мл)/сек/г ткани)	Уровень свободных радикалов, (RLU/мл)/сек/г ткани)	ОВБ, (отн. ед.)
Фон	270,31±60,40	3,78±0,35	65,86±11,37
Контроль	178,16±55,28'	4,74±0,45'	34,33±9,88'
Селен	215,64±63,00*	3,66±0,29#	62,11±19,06
Ламинария	89,80±24,49	2,91±0,33#	31,33±7,09

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с фоном при $p < 0,05$; # — различия достоверны по сравнению с контролем при $p < 0,05$; & — различия достоверны по сравнению с экспериментальной группой L при $p < 0,05$.

Note: * — statistically significant differences from the background values, $p < 0.05$ (Mann–Whitney U-test). # — statistically significant differences from the control group, $p < 0.05$ (Mann–Whitney U-test). & — statistically significant differences from the experimental group L , $p < 0.05$ (Mann–Whitney U-test).

ролем и практически достигал фоновых значений (табл. 2, рис. 3).

У крыс, получавших ламинарию, не обогащенную селеном, средние значения уровня АОА оказались сниженными по сравнению с контролем, но статистическая обработка показала, что различия между этими группами не значимы. Таким обра-

зом, не было выявлено восстановления окислительно-восстановительного баланса клеток тестикулярной ткани, но в то же время достоверно происходило снижение числа свободных радикалов — показатель Про снизился на 38,6%, что свидетельствует о высокой антирадикальной активности препарата.

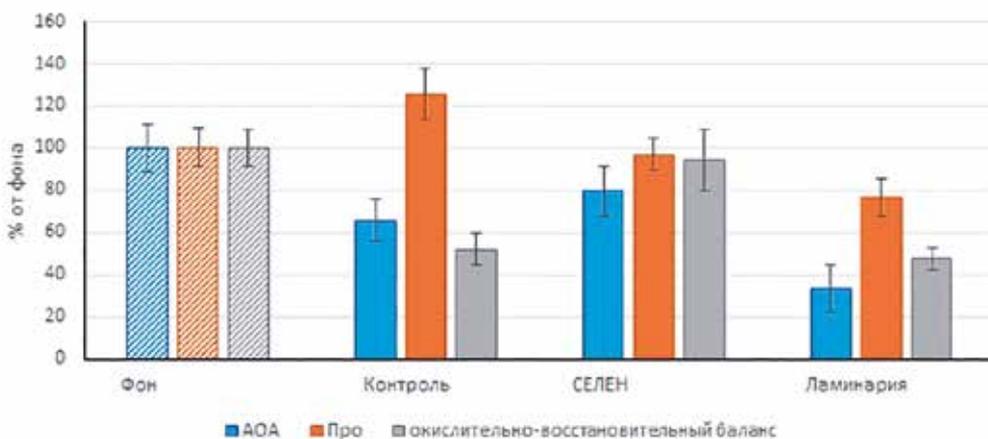


Рис. 3. Влияние селенобогатенной ламинарии на показатели окислительно-восстановительных реакций в клетках тестикулярной ткани. * — отличия статистически значимы по сравнению с фоном, $p < 0,05$ (U-критерий Манна—Уитни). # — отличия статистически значимы по сравнению с группой контроля, $p < 0,05$ (U-критерий Манна—Уитни). & — отличия статистически значимы по сравнению с экспериментальной группой L , $p < 0,05$ (U-критерий Манна—Уитни).

Fig. 3. Effect of selenium-enriched laminaria on indices of redox reactions in testicular tissue cells. * — differences statistically significant compared to background, $p < 0.05$ (Mann–Whitney U-test). # — differences statistically significant compared to the control group, $p < 0.05$ (Mann–Whitney U-test). & — differences statistically significant compared to the experimental group L , $p < 0.05$ (Mann–Whitney U-test).

Заключение

Таким образом, в модели патоспермии (олигоспермия, астеноспермия) селенобогатая ламинария оказалась эффективным средством, стимулирующим продуктивность сперматогенеза, что выразилось в увеличении общего количества половых клеток, приходящихся на хвостовую часть придатка семенника. Полученные результаты подтверждают данные литературы о влиянии селена на генерацию половых клеток [12, 21, 22]. Процесс сопровождался нормализацией окислительно-восстановительного баланса клеток тестикулярной ткани, что связано со способностью селена защищать сперматозоиды от активных форм кислорода.

Ламинария, не обогащенная селеном, не приводила к снижению степени выра-

женности олигоспермии, индуцируемой этопозидом, и не вызывала повышения количества сперматозоидов, но проявила выраженные антирадикальные свойства. Это снижает нагрузку на половые клетки активными формами кислорода, индуцируемыми этопозидом, что коррелирует с литературными данными о способности морских водорослей повышать устойчивость мужских половых клеток к окислительному стрессу [17, 24]. Также было отмечено существенное увеличение процента подвижных форм сперматозоидов, хотя окислительно-восстановительный баланс в клетках тестикулярной ткани крыс этой группы не восстанавливался. По-видимому, антирадикальный эффект имеет большее значение для восстановления подвижности клеток, чем нормализация редокс-потенциала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Боровская Т.Г., Вычужанина А.В., Шемерова Ю.А., Буравлев Е.В., Чукичева И.Ю., Кучин А.В. Экспериментальная оценка эффективности изоборнилфенолов в модели патоспермии и их влияние на антиоксидантный баланс мужских половых клеток. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022;173(6):697–702. [Borovskaya T.G., Vychuzhanina A.V., Shchemerova Yu.A., Buravlev E.V., Chukicheva I.Yu., Kuchin A.V. Eksperimental'naya otsenka effektivnosti izobornilfenolov v modeli patospermii i ikh vliyaniye na antioksidantnyy balans muzhskikh polovoykh kletok [Experimental Evaluation of the Effectiveness of Isobornylphenols in the Model of Pathospermia and Their Effect on the Antioxidant-Prooxidant Balance of Male Germ]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2022;173(6):697–702. (In Russian)].
2. Боровская Т.Г., Гольдберг В.Е., Полуэктова М.Е., Пахомова А.В., Шемерова Ю.А., Перова А.В., Румпель О.А. Отдаленные последствия цитостатических препаратов разных групп на репродуктивную функцию и пути их снижения. *Российский биотерапевтический журнал*. 2010;2:64–65. [Borovskaya T.G., Vychuzhanina A.V., Shchemerova Yu.A., Kseneva S.I., Fomina T.I., Bokhan E.A., Goldberg V.E. Otdalennyye posledstviya tsitostaticeskikh preparatov raznykh grupp na reproduktivnyuyu funktsiyu i puti ikh snizheniya [Long-term effects of cytostatic drugs of different groups on reproductive function and ways to reduce them]. *Russian Biotherapeutic Journal*. 2010;2:64–65. (In Russian)].
3. ГОСТ 33215-2014. *Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур*. М.: Стандартиформ, 2016:20. [GOST 33215-2014. *Rukovodstvo po sodержaniyu i ukhodu za laboratornymi zhitivnymi. Pravila oborudovaniya pomeshcheniy i organizatsii protsedur* [Guidelines for accommodation and care of animals. Environment, housing and management]. Moscow: Standartinform Publ., 2016:20. (In Russian)].
4. ГОСТ 33216-2014. *Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами*. М.: Стандартиформ, 2016:16. [GOST 33216-2014. *Rukovodstvo po sodержaniyu i ukhodu za laboratornymi zhitivnymi. Pravila sodержaniya i ukhoda za laboratornymi gryzunami i krolnikami* [Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits]. Moscow: Standartinform Publ., 2016:16. (In Russian)].
5. Корнеев И.А. Терапия мужского бесплодия: анализ исследований. *Медицинский совет*. 2019;(13):99–104. [Korneev I.A. Terapiya muzhskogo besplodiya: analiz issledovaniy [Male infertility treatments: clinical overview.] *Meditsinskiy sovet* [Medical Council]. 2019;(13):99–104. (In Russian)]. DOI: 10.21518/2079-701X-2019-13-99-104.
6. ОФС.1.2.2.2.0006.15 Селен. *Государственная фармакопея Российской Федерации*. XIV изд., Т. 1. М., 2018. [OFS.1.2.2.2.0006.15 Selenium. *Gosudarst-*

- vennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV ed., Part 1. Moscow, 2018. (In Russian)].
- Роживанов Р.В., Чернова М.О., Роживанова Е.Р., Есауленко Д.И. Коррекция окислительного стресса и репродуктивная реабилитация мужчин. *Проблемы репродукции*. 2023;29(6):106–115. [Rozhivanov R.V., Chernova M.O., Rozhivanova E.R., Yesaulenko D.I. Korrektsiya oksislitel'nogo stressa i reproduktivnaya reabilitatsiya muzhchin [Treatment of oxidative stress and male reproductive rehabilitation]. *Problemy reproduktivnoy okislitel'nogo stressa i reproduktivnaya reabilitatsiya muzhchin* [Russian Journal of Human Reproduction]. 2023;29(6):106–115. (In Russian)]. DOI: 10.17116/repro202329061106.
 - Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А.Н. Миронова. Т. 1. М.: Гриф и К, 2012:80–93. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv [Guidelines for conducting preclinical studies of medicines]. Ed. by A.N. Mironov. Vol. 1. Moscow: Grif i K Publ., 2012:80–93. (In Russian)].
 - Скопин П.И., Зорькина А.В., Скопина Ю.А., Минаева О.В. Производные 3-оксипиридина оптимизируют применение этопозида на модели карциномы легких Льюис. *Современные проблемы науки и образования*. 2012;6:272–281. [Skopin P.I., Zorkina A.V., Skopina Yu.A., Minaeva O.V. Proizvodnyye 3-oksipiridina optimiziruyut primeneniye etopozida na modeli kartsinomy legkikh L'yuis [3-hydroxypyridine derivatives optimize the use of etoposide in the Lewis lung carcinoma model]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern Problems of Science and Education]. 2012;6:272–281. (In Russian)].
 - Способ обогащения селеном морских организмов*. Лукьянова О.Н., Струппуль Н.Э., Приходько Ю.В. Патент RU 2272547 C2, 27.03.2006. Заявка № 2004115377/13 от 20.05.2004. [Sposob obogashcheniya selenom morskikh organizmov [Method for selenium enrichment of sea organisms]. Luk'yanova O.N., Struppul' N.E., Prikhod'ko Yu.V. Patent RU 2272547 C2, 27.03.2006. Application No. 2004115377/13 from 20.05.2004. (In Russian)].
 - Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России*. М.: АстраФармСервис, 2017:741. [Spravochnik Vidal'. Lekarstvennyye preparaty v Rossii [Reference Vidal. Medicines in Russia, Directory]. Moscow: AstraPharmService Publ., 2017:741. (In Russian)].
 - Ahsan U., Kamran Z., Raza I., Ahmad S., Babar W., Riaz M.H., Iqbal Z., Role of selenium in male reproduction — A review. *Animal Reproduction Science*. 2014;146(1–2):5–62. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.01.009.
 - Euroguide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. 2007 FELASA: Federation of European Laboratory Animal Science Associations. London W1D 7EG, UK.
 - European Convention for the protection of Vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS N 123) Guidelines for accommodation and care of animals (Article 5 of the Convention).
 - Ganga U.K., Kishori U., Reddy P.S. Cisplatin and/or etoposide induces oxidative stress in testicular, hepatic and kidney tissues in male albino mice. *J. Biol. Earth Sci.* 2013;2(2):249–254.
 - Hussain T., Kandeel M., Metwally E., Murtaza G., Kalhor H.D., Yin Y., Tan B., Chughtai M.I., Yaseen A., Afzal A., Kalhor M.S. Unraveling the harmful effect of oxidative stress on male fertility: A mechanistic insight. *Front. Endocrinol.* 2023;14:1070692. DOI: 10.3389/fendo.2023.1070692.
 - Ibrahim N.M., Ibrahim S.R., Ashour O.H., Abdel-Kader T.G., Hassan M.M., Ali R.S. The effect of Red Seaweed (*Chondrus crispus*) on the fertility of male albino rats. *Saudi J. Biol. Sci.* 2021;28(7):3864–3869. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.03.059.
 - Lane C.E., Mayes C., Druehl L.D., Saunders G.W. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology*. 2006;42:493–512. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2006.00204.x.
 - Levine H., Jørgensen N., Martino-Andrade A., Mendiola J., Weksler-Derri D., Jolles M., Pinotti R., Swan S.H. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. *Human Reproduction Update*. 2023;29(2):157–176. DOI: 10.1093/humupd/dmac035.
 - Muller C.H., Lee T.K., Montani M.A. Improved Chemi-luminescence assay for measuring antioxidant capacity of seminal plasma. *Method in Molecular Biology*. 2013;927:363–376. DOI: 10.1007/978-1-62703-038-0_31.
 - Qazi I.H., Angel C., Yang H., Zoidis E., Pan B., Wu Z., Ming Z., Zeng C.J., Meng Q., Han H., Zhou G. Role of Selenium and Selenoproteins in Male Reproductive Function: A Review of Past and Present Evidences. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(8):268. DOI: 10.3390/antiox8080268.
 - Ranawat P., Bansal M.P. Modulatory effects of Selenium on Spermatogenesis: Involvement of transcription factors CREB and CREM. *Am. J. Biomed. Sci.* 2010;2(4):329–341. DOI: 10.5099/aj100400329.
 - Sergienko V.I., Bondareva I.B. *Mathematical statistics in clinical research* [Electronic resource]: a practical guide. Moscow: GEOTAR-Media, 2006.
 - Wang P.T., Sudirman S., Hsieh M.C., Hu J.Y., Kong Z.L. Oral supplementation of fucoxanthin-rich brown algae extract ameliorates cisplatin-induced testicular damage in hamsters. *Biomed Pharmacother.* 2020;125:109–992. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.109992.
 - Wu P.Y., Scarlata E., O'Flaherty C. Long-Term Adverse Effects of Oxidative Stress on Rat Epididymis and Spermatozoa. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(2):170. DOI: 10.3390/antiox9020170.

26. Xu Z.J., Liu M., Niu Q.J., Huang Y.X., Zhao L., Lei X.G., Sun L.H. Both selenium deficiency and excess impair male reproductive system via inducing oxidative stress-activated PI3K/AKT-mediated

apoptosis and cell proliferation signaling in testis of mice. *Free Radic. Biol. Med.* 2023;197:15–22. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed. 2023.01.024.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Струппуль Надежда Эдуардовна*, к.б.н., доц., ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Школа медицины и наук о жизни; e-mail: struppul.nye@dvfu.ru

Nadezhda E. Struppul*, Cand. Sci (Biol.), Assoc. Prof., School of Medicine and Life Sciences of the Far Eastern Federal University; e-mail: struppul.nye@dvfu.ru

Силантьев Владимир Евгеньевич, к.х.н., ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Школа медицины и наук о жизни, ФГБУН «Институт химии» ДВО РАН; e-mail: vladimir.silantyev@gmail.com

Vladimir E. Silant'ev, Cand. Sci. (Chem.), School of Medicine and Life Sciences of the Far Eastern Federal University, Institute of Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences; e-mail: vladimir.silantyev@gmail.com

Боровская Татьяна Геннадьевна, д.б.н., проф., Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»; e-mail: repropharm@yandex.ru

Tatyana G. Borovskaya, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; e-mail: repropharm@yandex.ru

Пучкова Наталья Владимировна, «Приморский океанариум» — филиал ННЦ морской биологии ДВО РАН; e-mail: puchkova_nv@primocean.ru

Natalia V. Puchkova, «Primorsky Aquarium» — Branch of the National Scientific Center of Marine Biology of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Science; e-mail: puchkova_nv@primocean.ru

Соболева Екатерина Леонидовна, ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Школа медицины и наук о жизни; e-mail: soboleva.el@dvfu.ru

Ekaterina L. Soboleva, School of Medicine and Life Sciences of the Far Eastern Federal University; e-mail: soboleva.el@dvfu.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Лабораторкорм

Более десяти лет коллектив нашей организации обеспечивает высококачественным комбикормом для лабораторных животных научные медицинские и учебные учреждения России.

Реализуем:

- ✓ Оборудование для вивариев (клетки-стеллажи и др.);
- ✓ Подстилочный материал из древесной стружки;
- ✓ Зерно: пшеница, овес, ячмень,
- ✓ Премиксы.

НАШИ КОРМА
полнорационные,
сбалансированные по
аминокислотному составу,
минералам и витаминам



Доставка в любой регион России

Наш адрес: Москва, 2-й Вязовский проезд, д. 16, стр. 10

ООО «Лабораторкорм»

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 220-01-23

www.laboratorkorm.ru

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства»
Филиал «Андреевка»**

Филиал «Андреевка» образован на базе Центрального питомника лабораторных животных АМН СССР, который, в свою очередь, был создан в 1959 году. С тех пор основной задачей филиала «Андреевка» является получение и выращивание лабораторных животных. Филиал обеспечивает своих потребителей конвенциональными животными высокого качества, контролируемые по генетическим, физиологическим, морфологическим показателям состояния здоровья. Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев). С Филиалом сотрудничают более 200 потребителей лабораторных животных из России и стран СНГ. Основными потребителями являются научно-исследовательские учреждения РАН, Министерства здравоохранения РФ, Министерства обороны РФ, учебные заведения медико-биологического профиля.

Филиал «Андреевка» предлагает различных лабораторных животных. В их числе:
морские свинки;
генетически контролируемые колонии белых мышей (SHK, ICR) и крыс;
линейные мыши и крысы;
межлинейные гибриды мышей.

Адрес: 141551, Московская обл., Солнечногорский р-н, р/п. Андреевка, д. 49
телефон: +7(495)536-09-18; факс: +7(495)536-27-99
сайт: <http://www.andreevka.msk.ru/product.htm>

