

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

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

БИОМЕДИЦИНА

SCIENTIFIC JOURNAL

JOURNAL BIOMED

Том (Vol.) 21
2025

2



Уважаемые читатели!

21–22 мая 2025 года в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России прошла ежегодная XXI межрегиональная научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование».

Мы благодарны всем гостям и с радостью отмечаем стабильный рост числа участников: в этом году на конференции было представлено 87 докладов, что на треть больше, чем в прошлом году. Расширяется и географический охват мероприятия – мы впервые провели секцию «Биомедицинские основы фармакологии» в Республике Крым, на базе ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» (г. Симферополь). Большинство докладов были распределены в наши постоянные секции – «Методы и технологии в биомедицине», «Трансгеноз и критерии качества животных», «Проблемы биомоделирования в биомедицине», «Доклинические исследования в биомедицине» (в НЦБМТ ФМБА России, Московская область), а также «Прикладные аспекты клинической фармакологии» (в РГМУ Минздрава России, Ростов-на-Дону), «Современные проблемы фармакотоксикологии» (в СПХФУ Минздрава России, Санкт-Петербург). Значительное количество присланных работ повлекло необходимость открыть отдельную секцию «Аграрные аспекты биомедицины». Также мы возобновили секцию молодых учёных. В этом году выступления впервые транслировались онлайн, и все желающие имели возможность присоединиться к обсуждению в формате видеоконференции.

По традиции лучшие работы по результатам экспертизы Оргкомитета конференции будут опубликованы в виде кратких сообщений в ближайших выпусках научного журнала «Биомедицина».



ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»

БИОМЕДИЦИНА

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Издается с 2005 г.
4 выпуска в год

2025, Том 21, № 2

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. 2

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, д.б.н., 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 «МЕДИАКОЛОР» 127273, Москва, Сигнальный пр-д, 19, стр. 1
Дата выхода в свет:	10.06.2025

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dmitriy F. Khritinin, Dr. Sci. (Med.), Prof., 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:	10.06.2025

■ МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В.Н. Каркищенко, Н.В. Петрова, В.В. Слободенюк, Е.М. Колоскова, Н.А. Леднёва, М.А. Савина, Е.В. Панина, А.Г. Берзина

Определение видовой принадлежности кроликов породы Советская шиншилла с помощью ПЦР-фрагмента гена *цитохрома b* с последующим секвенированием продуктов амплификации8

А.Г. Берзина, Д.Х. Исмаилова, Д.В. Хвостов, М.А. Савина, Н.Н. Каркищенко

Поиск эффективных антител к производным морфина17

■ БИОТЕХНОЛОГИИ В БИОМЕДИЦИНЕ

Е.В. Росина, Е.Н. Калинина, С.Е. Зиганшина, Е.А. Коновалова, Е.С. Кормщикова

Модификация методики определения антиальфа-стафилолизина в плазме человека для фракционирования, осадке II+III и иммуноглобулиновых препаратах.27

С.С. Тимонова, А.А. Полупанова, И.А. Кирик, О.А. Карпунина, А.А. Федоров,

Е.В. Зубарева, В.В. Мягкова, А.А. Пискунов, Р.А. Хамитов

Изменение гликозилирования рекомбинантного иммуноглобулина человека подкласса IgG1 за счет подбора условий культивирования продуцентов и добавок37

■ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

М.Е. Алферова, И.И. Бобынцев, А.О. Ворвуль, А.Н. Тенькова,

Л.А. Андреева, Н.Ф. Мясоедов

Анксиолитические эффекты пептида GHK-GP и его структурных аналогов в тесте приподнятого крестообразного лабиринта49

А.С. Соломина, К.С. Качалов, А.В. Родина, А.Д. Дурнев, Л.Г. Колик

Модель гестационного сахарного диабета и ее фармакологическая валидация.58

Н.Ю. Тимофеева, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, О.Ю. Кострова,

И.С. Стоменская, Е.В. Москвичев

Клеточный состав надпочечников крыс-самцов при введении уретана71

■ METHODS AND TECHNOLOGIES OF BIOMEDICAL RESEARCH

Vladislav N. Karkischenko, Nataliya V. Petrova, Vladimir V. Slobodenyuk, Elena M. Koloskova, Nadezhda A. Ledneva, Mariya A. Savina, Elena V. Panina, Asya G. Berzina
Species Determination of Soviet Chinchilla Breed Rabbits
by PCR of a *Cytochrome b* Gene Fragment Followed
by Sequencing of Amplification Products8

Asya G. Berzina, Diana K. Ismailova, Daniil V. Khvostov, Maria A. Savina, Nikolay N. Karkischenko
Search for Effective Antibodies to Morphine Derivatives17

■ BIOTECHNOLOGIES IN BIOMEDICINE

Elena V. Rosina, Elena N. Kalinina, Svetlana E. Ziganshina, Ekaterina A. Konovalova, Elena S. Kormschikova
Modification of Determination Method for Staphylococcus Alpha Antitoxin in Human Plasma
for Fractionation, II + III Precipitate and Immunoglobulin Preparations 27

Sofia S. Timonova, Anna A. Polupanova, Inessa A. Kirik, Olga A. Karpunina, Alexander A. Fedorov, Ekaterina V. Zubareva, Vera V. Myagkova, Alexander A. Piskunov, Ravil A. Khamitov
Altered Glycosylation of Subclass IgG1 Recombinant Human Immunoglobulin
by Selecting Culture Conditions for Producers and Additives. 37

■ NON-CLINICAL RESEARCH IN BIOMEDICINE

Marina E. Alferova, Igor I. Bobyntsev, Anton O. Vorvul, Anna N. Tenkova, Lyudmila A. Andreeva, Nikolay F. Myasoedov
Anxiolytic Effects of GHK-GP Peptide and its Structural Analogues
in Elevated Plus Maze Test 49

Anna S. Solomina, Kirill S. Kachalov, Anastasia V. Rodina, Andrey D. Durnev, Larisa G. Kolik
Gestational Diabetes Mellitus Model and its Pharmacological Validation 58

Natalia Yu. Timofeeva, Gleb Yu. Struchko, Larisa M. Merkulova, Olga Yu. Kostrova, Irina S. Stomenskaya, Evgenij V. Moskvichev
Cellular Composition of Male Rat Adrenal Glands upon Urethane Administration. 71

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОЛИКОВ ПОРОДЫ СОВЕТСКАЯ ШИНШИЛЛА С ПОМОЩЬЮ ПЦР-ФРАГМЕНТА ГЕНА ЦИТОХРОМА *b* С ПОСЛЕДУЮЩИМ СЕКВЕНИРОВАНИЕМ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

В.Н. Каркищенко¹, Н.В. Петрова^{1,*}, В.В. Слободенюк¹, Е.М. Колоскова², Н.А. Леднёва¹,
М.А. Савина¹, Е.В. Панина¹, А.Г. Берзина¹

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

² Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных —
филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

В статье приведены данные об определении пригодности гена *CYTB* для типирования кроликов породы Советская шиншилла. Детекцию целевого фрагмента гена *CYTB* проводили с помощью ПЦР в реальном времени с использованием высокоспецифичных праймеров и зонда на амплификаторе, продукт ПЦР использовали в реакции секвенирования по Сэнгеру. В результате эксперимента выяснилось, что ген *митохондриального цитохрома b* может выступать в качестве маркера генетической оценки чистоты породы кроликов Советская шиншилла и пригодности особей для дальнейшей селекции. Метод секвенирования данного участка гена *цитохрома b* показал свою эффективность, практическую значимость и позволил за достаточно короткий срок провести скрининг животных для их использования в селекционно-генетической работе или иных исследовательских целях.

Ключевые слова: кролики, секвенирование по Сэнгеру, ПЦР в реальном времени, *цитохром b*

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Колоскова Е.М., Леднёва Н.А., Савина М.А., Панина Е.В., Берзина А.Г. Определение видовой принадлежности кроликов породы Советская шиншилла с помощью ПЦР-фрагмента гена *цитохрома b* с последующим секвенированием продуктов амплификации. *Биомедицина*. 2025;21(2):8–16. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-8-16>

Поступила 18.04.2025

Принята после доработки 15.05.2025

Опубликована 10.06.2025

SPECIES DETERMINATION OF SOVIET CHINCHILLA BREED RABBITS BY PCR OF A CYTOCHROME *b* GENE FRAGMENT FOLLOWED BY SEQUENCING OF AMPLIFICATION PRODUCTS

Vladislav N. Karkischenko¹, Nataliya V. Petrova^{1,*}, Vladimir V. Slobodenyuk¹,
Elena M. Koloskova², Nadezhda A. Ledneva¹, Mariya A. Savina¹, Elena V. Panina¹, Asya G. Berzina¹

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

² All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal
Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institut Village

The article presents data on determining the suitability of the *CYTB* gene for typing rabbits of the Soviet Chinchilla breed. The detection of the target site of the *CYTB* gene was carried out by real-time PCR using highly specific primers and an amplifier probe; the PCR product was used in the Sanger sequencing reaction. The experiment determined that the *mitochondrial cytochrome b* gene can act as a marker for the genetic assessment of the purity of the Soviet Chinchilla rabbit breed and the suitability of individuals for further breeding. The method of sequencing of this section of the *cytochrome b* gene showed its efficacy and practical significance, allowing animals to be screened over a fairly short period of time for their use in breeding and genetic work or other research purposes.

Keywords: rabbits, Sanger sequencing, real-time PCR, *cytochrome b*

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

For citation: Karkischenko V.N., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Koloskova E.M., Ledneva N.A., Savina M.A., Panina E.V., Berzina A.G. Species Determination of Soviet Chinchilla Breed Rabbits by PCR of a *Cytochrome b* Gene Fragment Followed by Sequencing of Amplification Products. *Journal Biomed.* 2025;21(2):18–16. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-8-16>

Submitted 18.04.2025

Revised 15.05.2025

Published 10.06.2025

Введение

Кролики (лат. *Oryctolagus cuniculus domesticus*) являются одним из наиболее часто используемых видов лабораторных животных в медико-биологических исследованиях. На кроликах разработано большое количество моделей различных заболеваний человека. Эти животные широко используются для оценки безопасности субстанций и лекарственных препаратов.

Однако биоинформационные исследования генетических расстояний для 2793 генов врождённой иммунной системы человека, кролика, а также мыши, доступных в базе данных NCBI, показали, что у 88% этих генов генетическое сходство между человеком и кроликом больше, чем между человеком и мышью. Результаты объясняются увеличением частоты мутаций у мыши и ясно показывают, что кролик является лучшей моделью для изучения генов врождённой иммунной системы, чем лабораторная мышь [14].

Широкое использование кроликов в биомедицинских исследованиях обусловлено относительной простотой и низкой стоимостью их содержания по сравнению с такими лабораторными животными, как кошки, со-

баки и обезьяны. В Российской Федерации одной из традиционно используемых пород в биомедицинских исследованиях является Советская шиншилла, созданная путем скрещивания мелких кроликов породы Шиншилла с Белым великаном. Утверждена порода в 1963 году. Животные этой породы выносливы, неприхотливы и хорошо размножаются в различных климатических условиях, что послужило их широкому применению в качестве лабораторных в биологии, медицине и ветеринарии [5]. В токсикологии кролики традиционно являются моделью для изучения токсичности кожных лекарственных форм. На них проводят исследования имплантатов и других медицинских изделий [4]. Кролики используются в исследованиях по изучению патофизиологии и терапии легочных заболеваний. Воспалительные реакции, которые воспроизводятся на них, особенно при астме, сравнимы с таковыми у людей. Кроме того, легкие кроликов являются органом-мишенью для анафилактической реакции, что также сходно с клинической ситуацией у людей [9]. Кролики имеют много общих анатомических и биохимических офтальмологических характеристик

с людьми. Размер глаза делает этих животных удобной моделью для исследований в офтальмологии при изучении различных заболеваний у человека, включая синдром сухого глаза, глаукому, возрастную дегенерацию желтого пятна, индуцированную светом ретинопатию, катаракту и увеит [13, 16]. На кроликах разработан метод индукции пролиферации эндотелиальных клеток роговицы, который может быть использован для лечения дистрофии роговицы Фукса [8, 10]. Кролик является одной из лучших моделей для изучения инфекционных заболеваний: бактериальных (сифилис, туберкулез) и вирусных инфекций (ВИЧ, папилломавирус, вирус простого герпеса, вирусы оспы, норовирусы) [12].

В течение последних десятилетий для биомедицинских исследований все большее внимание уделяется созданию трансгенных кроликов. С появлением технологий редактирования генома, особенно CRISPR-Cas9, с 2014 года получено множество кроликов с нокаутированными генами (KO), с внедренными с помощью гомологичной репарации (HDR) генами (KI) для воспроизведения генетических патологий человека — т. н. «гуманизированные» животные [3, 6, 7, 15]. В ближайшие годы с помощью этой технологии количество таких животных будет только расти. Большое значение имеет получение трансгенных кроликов-биореакторов — источников биологически ценных белков, в т.ч. и белков человека биомедицинского и биотехнологического назначения [1, 2].

Отдельного внимания заслуживает вопрос об использовании кроликов в иммунологии. Данные животные являются гипериммунными и участвуют в исследовании и разработке иммунологических методов более 100 лет в качестве продуцентов диагностических антител. Кроличьи антитела — как поликлональные, так и моноклональные (МАТ) — являются основным источником для получения диагностиче-

ских и терапевтических препаратов [11]. Высокое сродство и специфичность к антигенам кроличьих МАТ по сравнению с мышинными объясняют их несомненное преимущество в использовании на практике. Благодаря последним достижениям в области гибридных технологий кроличьи МАТ будут широко применяться в терапевтических и диагностических целях в ближайшие годы [17].

Научные исследования, проводимые на кроликах породы Советская шиншилла, требуют поддержания и сохранения чистоты данной линии. Племенная работа включает в себя отбор особей для размножения с помощью простых и наиболее оптимальных методов типирования.

Надежными и быстрыми методами типирования являются молекулярно-генетические методы. Наиболее перспективными мишенями генетического типирования являются митохондриальные гены, в частности, ген митохондриального *цитохрома b* (*CYTB*), который широко используется в качестве молекулярного маркера для определения филогенетических связей на различных уровнях при систематизации. В настоящем исследовании ген *CYTB* использовался в качестве маркера для типирования кроликов породы Советская шиншилла.

Целью данной работы являлось определить пригодность гена *CYTB* для типирования кроликов породы Советская шиншилла.

Материалы и методы

Кролики породы Советская шиншилла были получены из филиала «Электрогорский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.), где содержались в механизированных крольчатниках с регулярной сменой подстилки, на стандартном рационе для кроликов со сбалансированным кормлением (сено, зерновые корма, свежая трава и овощи, витаминно-минеральные добавки) и постоянным доступом к воде.

В работе было использовано 8 самцов породы Советская шиншилла в возрасте 6 мес.

Биоматериал для генетического анализа

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов крови кроликов разного пола и возраста, определенных в питомнике как порода Советская шиншилла.

Выделение ДНК

Получение препаратов ДНК проводили с использованием набора реагентов МАГНО сорб (“AmpliSens”, Россия) и станции для выделения нуклеиновых кислот KingFisher Flex (“Thermo Fisher Scientific”, Финляндия). Готовые растворы ДНК хранили при температуре не выше -16°C не более 1 мес.

Подбор праймеров

Для определения нуклеотидной последовательности праймеров и зонда было использовано программное обеспечение Vector NTI (“Thermo Fisher Scientific”, США) и база данных BLAST. Синтез праймеров осуществлялся ООО «ДНК синтез» (Россия).

Проведение ПЦР в реальном времени

Детекцию целевого фрагмента гена *CYTb* проводили с помощью ПЦР в реальном времени с использованием высокоспецифичных праймеров и зонда (ООО «ДНК-Синтез», Россия) на амплификаторе («ДНК Технология», Россия). Продукт ПЦР использовали в реакции секвенирования по Сэнгеру.

Секвенирование по Сэнгеру

Процедуру проводили с использованием прямого и обратного праймеров на секвенаторе Genetic Analyser 3500 (Applied Biosystems). Обработку полученных результатов, сравнение и выравнивание по-

следовательностей проводили с помощью программного обеспечения Vector NTI и онлайн-модуля BLAST Align (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

Дизайн системы для ПЦР детекции фрагментов гена *CYTb* у кроликов породы Советская шиншилла

ПЦР в реальном времени позволяет быстро и качественно определить наличие гена *CYTb*, однако для более детального анализа нуклеотидной последовательности с целью типирования кроликов породы Советская шиншилла требуется проведение секвенирования эпитопа. В табл. 1 представлены праймеры и зонд, используемые для ПЦР в реальном времени и для секвенирования.

Полученные таким образом ампликоны могут быть использованы в дальнейшем как для верификации наличия гена *CYTb* методом детекции ДНК в режиме реального времени, так и в качестве материала для определения точной нуклеотидной последовательности методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и их обсуждение

Проведение ПЦР в реальном времени и подтверждение соответствия участка гена *CYTb* кроликов заявленной породе Советская шиншилла методом секвенирования по Сэнгеру

Секвенирование является одним из ключевых методов в молекулярной биологии, который позволяет точно установить первичную последовательность нуклеотидов в цепи ДНК. Полученные при этом первичные данные с помощью специальных программ и анализа методами биоинформатики могут быть использованы для

Таблица 1. Праймеры для ПЦР детекции гена *CYTb*
Table 1. Primers for PCR detection of the *CYTb* gene

Праймер	Последовательность 5'-3'	Размер, п.н
SVcbF	GGCCTGTGCTTAATCATTTCA	238
SVcbR	TGCCGATGTTTCAGGTTTCT	
SVcbZ	ROX-GTTGACTTATTCGATATCTCCATGC-BHQ-2	

картирования ДНК, поиска последовательностей и других целей. В нашем случае использование данного метода позволяет подтвердить нуклеотидную последовательность участка гена *CYTb*, полученного в результате ПЦР в реальном времени, последовательности *CYTb*, характерной для породы кроликов Советская шиншилла.

В качестве матрицы для ПЦР в реальном времени и последующего секвенирования использовали ДНК кроликов породы Советская шиншилла, полученную из выделенного препарата образцов крови. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена *CYTb* кроликов проводили выравниванием полученных сиквенсов относительно нуклеотидной последовательности *CYTb* кроликов породы Советская шиншилла, взятой из базы данных NCBI (GenBank: FM205927.1).

Секвенирование проводили с использованием и прямого, и обратного праймеров.

На рис. 1 и 2 представлен пример сиквенса с прямым и обратным праймером нуклеотидной последовательности гена *CYTb*.

В работе использовали программу VectorNTI, приложение Align.

Результаты секвенирования

Последовательность пробы f_C2_E01_05 (секвенирование с праймером SVcbF)

GGCCTGTGCTTAATCATTCAAATT
TAACTGGTCTCTTCCTAGCCATATA
TTACACCTCAGACACAATAACAGC
ATTCTCATTTGGTAACTCATATTTGCC
GAGACATAAAACCATGGTTGACTTAT
TYGATATCTCCATGCCAATGGAGCA-
TCGATATTTTTATTTCCTCTATATACA

Сравнение полученной последовательности секвенирования гена *CYTb* кроликов Советской шиншиллы с последовательностью из базы данных NCBI (GenBank: FM205927.1)

Последовательность пробы r_C2_E02_05 (секвенирование с праймером SVcbR)

CCATATATTACCTCAGACACAATAA
CAGCATTTCTCATTTGGTAACTCATATTTG
CCGAGACATAAAACCATGGTTGACTTATT
CGATATCTCCATGCCAATGGAGCATCGA
TATTTTTTATTTGCCTCTATATACA
GGCCWTTGGAATCTATTATGGCTCATATA
CATATCTAGAAACCTGAAACATCGGCA

Сравнение полученной последовательности секвенирования гена *CYTb* кроликов советской шиншиллы с последователь-

```
Query 1 GGCCTGTGCTTAATCATTCAAATTTTAACTGGTCTCTTCCTAGCCATATATTACACCTCA 60
      |||
Sbjct 43 GGCCTGTGCTTAATCATTCAAATTTTAACTGGTCTCTTCCTAGCCATATATTACACCTCT 102
Query 61 GACACAATAACAGCATTCTCATTTGGTAACTCATATTTGCCGAGACATAAAACCATGGTTGA 120
      |||
Sbjct 103 GACACAATAACAGCATTCTCATTTGGTAACTCATATTTGCCGAGACATAAAACCATGGTTGA 162
Query 121 CTTATTGATATCTCCATGCCAATGGAGCATCGATATTTTTTATTTCCTCTATATACA 179
      |||
Sbjct 163 CTTATTCGATATCTCCATGCCAATGGAGCATCGATATTTTTTATTTCCTCTATATACA 221
```

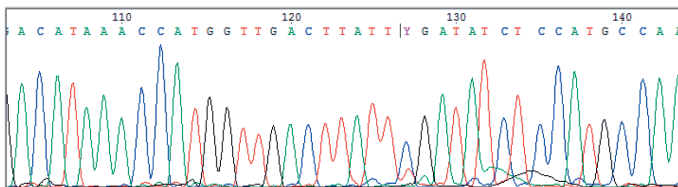


Рис. 1. Пример сиквенса с прямым праймером SVcbF.

Примечание: Y=C.

Fig. 1. An example of a sequence with a direct SVcbF primer.

Note: Y=C

```

Query 12  GCCATATATTACACCTCAGACACAATAACAGCATTCTCATTGGTAACTCATATTTGCCGA 71
          |||
Sbjct 85  GCCATATATTACACCTCTGACACAATAACAGCATTCTCATTGGTAACTCATATTTGCCGA 144
Query 72  GACATAAACCATGGTTGACTTATTCGATATCTCCATGCCAATGGAGCATCGATATTTT 131
          |||
Sbjct 145 GACATAAACCATGGTTGACTTATTCGATATCTCCATGCCAATGGAGCATCGATATTTT 204

Query 132  ATTTGCCTCTATATACAYGTAGGCCGTGGAATCTATTATGGCTCATATACATATCTAGAA 191
          |||
Sbjct 205  ATTTGCCTCTATATACACGTAGGCCGTGGAATCTATTATGGCTCATATACATATCTAGAA 264
Query 192  ACCTGAAACATCGGCA 207
          |||
Sbjct 265  ACCTGAAACATCGGCA 280|

```

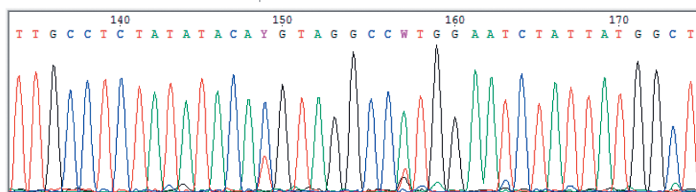


Рис. 2. Пример сиквенса с обратным праймером SVcbR.

Примечание: Y=C, W=A.

Fig. 2. An example of a sequence with a reverse SVcbR primer.

Note: Y=C, W=A.

ностью из базы данных NCBI (GenBank: FM205927.1).

На основе данных нуклеотидных последовательностей, полученных в результате секвенирования гена *CYTb* кроликов породы Советская шиншилла с прямым и обратным праймерами (SVcbF/SVcbR), выстроена следующая нуклеотидная последовательность:

GGCCTGTGCTTAATCATTCAAATTTTA
ACTGGTCTCTTCTAGCCATATATTACA
CCTCAGACACAATAACAGCATTCTCAT
TGGTAACTCATATTTGCCGAGACATAAA
CCATGGTTGACTTATTCGATATCTCCAT
GCCAATGGAGCATCGATATTTTATTT
GCCTCTATATACACGTAGGCCATGGAAT
CTATTATGGCTCATATACATATCTAGAAA
CCTGAAACATCGGCA

Данная последовательность соответствует референсной нуклеотидной последовательности гена *CYTb* кролика породы Советская шиншилла в базе данных NCBI (Oryctolagus cuniculus mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, breed Soviet Chinchilla Sequence ID: FM205927.1).

Закключение

При ведении племенной работы с кроликами породы Советская шиншилла, а также планировании проведения технологии редактирования генома CRISPR-Cas9 для получения нокаутированных кроликов для воспроизведения генетических патологий человека необходимо проводить оценку чистоты породы с помощью простых и наиболее оптимальных методов типирования. Периодический генетический анализ поголовья животных позволит вести контроль чистоты линии, а также осуществлять качественный отбор особей для размножения, которые будут максимально соответствовать задачам предстоящих исследований. Контроль генетической чистоты и отбор наиболее перспективных особей для размножения лежат в основе эффективной селекционно-генетической работы. В качестве маркера генетической оценки чистоты породы кроликов Советская шиншилла и пригодности особей для дальнейшей селекции может выступать ген *митохондриального цитохрома b*. Метод секвенирования

данного участка гена *цитохрома b* показал свою эффективность и практическую значимость. Метод позволяет за достаточно короткий срок провести скрининг животных для их использования в селекционно-генетической работе или иных исследовательских целях.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что выполненная нами работа позволила получить доказательства пригодности гена *CYTB* для типирования кроликов породы Советская шиншилла молекулярно-генетическим методом секвенирования по Сэнгеру.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Езерский В.А., Колоскова Е.М. Генетическая конструкция для замещения гена кислого сывороточного протеина кролика при использовании CRISPR/Cas9 метода. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2019;4:23–35. [Ezerskii V.A., Koloskova E.M. Geneticheskaya konstrukcia dlya zameshenia gena kislogo sivorotochnogo proteina krolika pri ispolsovanii CRISPR/Cas9 metoda [Genetic construction for replacement of rabbit whey acidic protein gene using the CRISPR/Cas9 method]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* [Problems of biology of productive animals]. 2019;4:23–35. (In Russian)].
2. Езерский В.А., Шишиморова М.С., Тевкин С.И., Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Безбородова О.А. и др. Интеграция и тканеспецифическая экспрессия гена лактоферрина человека в молочной железе трансгенных кроликов. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2013;4:33–52. [Ezerskii V.A., Shishimorova M.S., Tevkin S.I., Trubitsina T.P., Koloskova E.M., Bezborodova O.A., et al. Integratsiyai i tkanetspetsificheskaya ekspressiya gena laktoferrina cheloveka v molochnoi zheleze transgennykh krolikov [Integration and tissue-specific expression of human lactoferrin gene in mammary gland of transgenic rabbits]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* [Problems of biology of productive animals]. 2013;4:33–52. (In Russian)].
3. Колоскова Е.М., Каркищенко В.Н., Езерский В.А., Петрова Н.В., Максименко С.В., Матвеев Е.Л. Трансгенные и нокдаунные кролики в биомедицине и генотерапии. CRISPR/Cas9-технологии (обзор). *Биомедицина*. 2019;15(4):12–33. [Kolosko-va E.M., Karkischenko V.N., Ezerskii V.A., Petrova N.V., Maksimenko S.V., Transgennee i nokautnie kroliki v biomedicine i genoterapii. CRISPR/Cas9-technologii (obzor) [Rabbit biomodels of human diseases developed using new genomic technologies. Crispr/cas9 (review)]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2019;15(4):12–33. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-4-12-33.
4. Макарова М.Н., Макаров В.Г. Использование кроликов в доклинических исследованиях. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2023;3(6):18–43. [Makarova M.N., Makarov V.G. Ispolzovanie krolikov v doklinicheskikh issledovaniyakh [Rabbits in preclinical research]. *Laboratornieivotnie dlya nauchnih issledovaniy* [Laboratory animals for science]. 2023;3(6):18–43. (In Russian)]. DOI: 10.57034/2618723X-2023-03-0.
5. Юращик С.В. *Кролиководство*. Уч. пособ. для высших учебных заведений. Гродно: УО «ГГАУ», 2005:412. [Yurashnik S.V. *Krolikovodstvo* [Rabbit breeding]. Uch. posob. dlya visshih uchebnykh zavedeniy [Study guide for higher education institutions]. Grodno: UO “GGAU”, 2005:412 (In Russian)].
6. Fan J., Challah M., Watanabe T. Transgenic rabbit models for biomedical research: current status, basic methods and future perspectives. *Pathol. Int.* 1999;49(7):583–594. DOI: 10.1046/j.1440-1827.1999.00923.x.
7. Fan J., Wang Y., Chen Y.E. Genetically Modified Rabbits for Cardiovascular Research. *Front. Genet.* 2021;12:614379. DOI: 10.3389/fgene.2021.614379.
8. Okumura N., Matsumoto D., Fukui Y., Teramoto M., et al. Feasibility of cell-based therapy combined with descemetorhexis for treating Fuchs do the lialcorneal dystrophy in rabbit model. *PLoSOne*. 2018;13(1):e0191306. DOI:10.1371/journal.pone.0191306.
9. Kamaruzaman N.A., Kardia E., Kamaldin N., Latahir A.Z., Yahaya B.H. The rabbit as a model for studying lung disease and stemcelltherapy. *Biomed. Res. Int.* 2013;691830. DOI: 10.1155/2013/691830.
10. Kinoshita S., Koizumi N., Ueno M., et al. Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullouskerato pathy. *N. Engl. J. Med.* 2018;378:995–1003.
11. Mage R.G., Lanning D., Knight K.L. B cell and antibody repertoire development in rabbits: the requirement of gut-associated lymphoid tissues. *Dev. Comp. Immunol.* 2006;30(1–2):137–153. DOI: 10.1016/j.dci.2005.06.017.
12. Mage R.G., Esteves P.J., Rader C. Rabbit models of human diseases for diagnostics and therapeutics development. *Dev. Comp. Immunol.* 2019;92:99–104. DOI: 10.1016/j.dci.2018.10.003.
13. Sebbag L., Mochel J.P. An eye on the dog as the scientist’s best friend for translation al research in ophthalmology: Focus on the ocular surface. *Med. Res. Rev.* 2020;40(6):2566–2604. DOI: 10.1002/med.21716.
14. Soares J., Pinheiro A., Esteves P.J. The rabbit as an animal model to study innate immunity genes: Is it better than mice? *Front. Immunol.* 2022;13:981815. DOI: 10.3389/fimmu.2022.981815.

15. Young S., Forsberg-Nilsson K., Good J.M., Lander E.S., et al. Rabbit genome analysis reveals polygenic basis for phenotypic change during domestication. *Science*. 2014;346(6200):1074–1079. DOI: 10.1126/science.1253714.
16. Zernii E.Y., Baksheeva V.E., Iomdina E.N., et al. Rabbit Models of Ocular Diseases: New Relevance for Classical Approaches. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 2016;15(3):267–291. DOI: 10.2174/187152731566615110124957.
17. Zhang Z., Liu H., Qian Q., Wang L., Yuan H. Advances in the Isolation of Specific Monoclonal Rabbit Antibodies. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:494. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00494.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

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

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

Elena M. Koloskova, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Леднёва 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

Савина Мария Анатольевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: graff22@mail.ru

Mariya A. Savina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: graff22@mail.ru

Панина Елена Витальевна, к.б.н., доц., ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: epanina@rgau-msha.ru

Elena V. Panina, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.,
Scientific Center of Biomedical Technologies
of the Federal Medical and Biological Agency
of Russia;

e-mail: epanina@rgau-msha.ru

Берзина Ася Григорьевна, к.б.н., ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
ФМБА России»;

e-mail: berzina07@mail.ru

Asya G. Berzina, Cand. Sci. (Biol.), Scientific
Center of Biomedical Technologies of the Federal
Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: berzina07@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-17-26>



ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ АНТИТЕЛ К ПРОИЗВОДНЫМ МОРФИНА

А.Г. Берзина^{1,*}, Д.Х. Исмаилова¹, Д.В. Хвостов^{1,2}, М.А. Савина¹, Н.Н. Каркищенко¹

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

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

Предложена схема иммунизации коз производными морфина, конъюгированными с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Показано, что антитела к морфину образуются в высоких титрах в сыворотке крови (2×10^{-6}) и молоке коз (1×10^{-4}). Специфичность антител к морфину доказана с помощью методов ИФА и Вестерн-блот.

Ключевые слова: антитела, иммунизация, козы, морфин, специфичность

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Берзина А.Г., Исмаилова Д.Х., Хвостов Д.В., Савина М.А., Каркищенко Н.Н. Поиск эффективных антител к производным морфина. *Биомедицина*. 2025;21(2):17–26. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-17-26>

Поступила 04.04.2025

Принята после доработки 14.05.2025

Опубликована 10.06.2025

SEARCH FOR EFFECTIVE ANTIBODIES TO MORPHINE DERIVATIVES

Asya G. Berzina^{1,*}, Diana K. Ismailova¹, Daniil V. Khvostov^{1,2},
Maria A. Savina¹, Nikolay N. Karkischenko¹

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

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

A scheme for immunization of goats with morphine derivatives conjugated with bovine serum albumin (BSA) is proposed. It was shown that antibodies to morphine are formed in high titers in blood serum (2×10^{-6}) and goat milk (1×10^{-4}). The specificity of antibodies to morphine was confirmed using ELISA and Western blot methods.

Keywords: antibodies, immunization, goats, morphine, specificity

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

For citation: Berzina A.G., Ismailova D.K., Khvostov D.V., Savina M.A., Karkischenko N.N. Search for Effective Antibodies to Morphine Derivatives. *Journal Biomed*. 2025;21(2):17–26. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-17-26>

Submitted 04.04.2025

Revised 14.05.2025

Published 10.06.2025

Введение

На протяжении почти двух десятилетий коллективы НЦБМТ ФМБА России (до 2013 года — НЦБМТ РАМН) и НИИ наркологии им. В.П. Сербского искали различные пути, направленные на поиск антител, специфически связывающих морфин и его производные. Ввиду важнейшей медицинской значимости опиатов и их столь же высокой социальной опасности в качестве наркотиков взгляды на механизм, действие и показания к применению менялись по мере прогресса биомедицинских наук.

При разработке вакцины от опиатной зависимости сотрудниками ННЦ наркологии — филиала ФГБУ «НМИЦПН им. В.П. Сербского» была использована технология получения поликлональных антител, включающая иммунизацию лабораторных животных белковыми конъюгатами двух производных морфина — 6-гемисульфонильным (6ГСМ) и 3-О-карбоксиметильным (ЗКММ). Было установлено, что при использовании такого суммарного иммуногена можно получить антитела, в одинаковой степени узнающие морфин, героин, кодеин и продукты их метаболизма. В ходе работы были получены антиморфиновые антитела на кроликах и мини-свиньях Светлогорской популяции [1]. Полученные первичные антитела к морфину были использованы в качестве иммуногена при создании антиидиотипической вакцины от опиатной зависимости [4]. При испытаниях на лабораторных животных в качестве адъювантов использовались липосомы и наночастицы бетулина [3, 8]. Несмотря на полученные первые обнадеживающие результаты, эта работа была приостановлена по ряду причин экономического характера. Помимо поликлональных кроличьих и свиных антител к двум производным морфина при совместной работе с НИИ ОЧБ ФМБА России (Санкт-Петербург) нами были получены и запатентованы моноклональные антитела к двум производ-

ным морфина — клоны ЗКММ и 6ГСМ [6, 7]. В гуманизированном виде они могли найти свое применение в иммунотерапевтических целях, но в силу сложившихся обстоятельств работа также была остановлена.

Современная биомедицина исследует новые иммунологические подходы к лечению зависимостей и связанных состояний. К ним относятся *пассивная иммунотерапия* (введение готовых антител, способных нейтрализовать наркотик в организме) и *активная вакцинация* (стимуляция выработки собственных антител против вещества-зависимости). Особенно актуальны такие методы для опиоидов (морфин, героин, фентанил и др.) на фоне мирового кризиса опиоидной зависимости [9]. Помимо лечения самой зависимости, обсуждается потенциальное влияние иммунотерапевтических методов на сопутствующие проблемы: болевой синдром, тревожно-депрессивные расстройства и психосоциальную адаптацию пациентов. Также важно понимать, какие препараты на основе антител уже используются в клинике (в т. ч. в России) и почему не все антитела пригодны для терапии.

Антиморфиновые антитела — это иммуноглобулины, специфически связывающие морфин или близкие опиоидные молекулы. В медицинской практике их предполагаемое применение — нейтрализация опиоидов в организме с терапевтической целью (не включая диагностические тесты). За последние ~10 лет за рубежом проведены обширные доклинические исследования и начаты первые клинические испытания таких антител.

Принимая во внимание успехи зарубежных авторов по пассивной иммунизации при лечении опиоидной зависимости, нами была возобновлена работа по получению поликлональных антиморфиновых антител. Учитывая то обстоятельство, что Минздравом России было разрешено применение козьих антител для пассивной

иммунотерапии от вируса Эбола, а также то обстоятельство, что козы являются гипериммунными животными и хорошими продуцентами антител, нами была начата работа по получению козьих антиморфиновых антител.

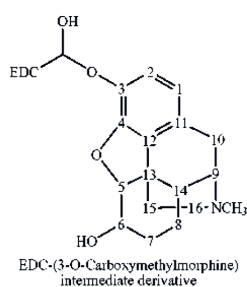
Цель работы — получить специфические антитела к морфину путем иммунизации коз производными морфина: 3-О-карбоксиметильным (КММ) и 6-гемисукцинилным (ГСМ), конъюгированным с белком БСА; определить титр антител в сыворотке крови и молоке иммунизированных коз, проверить специфичность антител к морфину методом Вестерн-блот и ИФА.

Материалы и методы

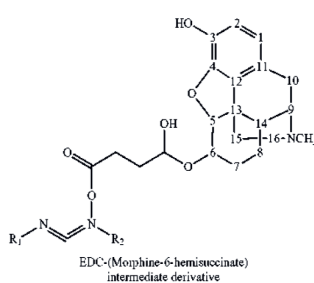
Для получения антител к морфину в работе были использованы ранее синтезированные антигены — конъюгаты производных морфина с бычьим сывороточным альбумином (БСА): 6-гемисукцинилным (ГСМ) и 3-О-карбоксиметильным (КММ) эфирами. При постановке иммуноферментного анализа (ИФА) использовали 2-р-карбоксибензилазометильное производ-

ное, конъюгированное с гетерологичным белком-лизоцимом (ФАМ-Лиз) (рис. 1). Методика синтеза конъюгатов описана в патенте [4]. Работа по изучению влияния дозы антигена на титр иммунных сывороток к производным морфина проводилась путем иммунизации двух коз породы Русская белая по предложенной нами схеме (табл. 1). Для усиления иммунного ответа использовали адъювант Фрейнда полный (ПАФ) и неполный (НАФ) (Sigma-Aldrich).

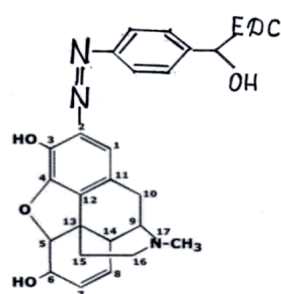
Забор крови для тестирования на наличие антител осуществляли из краниальной полой вены. Сыворотки крови и молоко тестировали непрямым методом ИФА, используя в качестве антигена на твердой фазе ФАМ-лизоцим. Для определения антител использовали антивидовой конъюгат Monoclonal Anti-Goat Antibody +Ph (Sigma-Aldrich). Оптимизацию условий ИФА проводили с использованием метода «шахматного» титрования. Для блокировки свободных сайтов связывания на планшете в лунки вносили по 150 мкл блокирующего буфера (PBS, 3% БСА), инкубировали 30 мин при комнатной температуре. В качестве субстрата ферментативной реакции использовали р-р те-



КММ
EDC-(3-О-
карбоксиметильное
производное морфина)



ГСМ
EDC-(6-
гемисукцинилное
производное морфина)



ФАМ
EDC-(2-р-карбокси-
бензилазометильное
производное морфина)

Рис. 1. Структурные формулы производных морфина, участвующих в конъюгации с белком-носителем.
Fig. 1. Structural formulas of morphine derivatives involved in conjugation with a carrier protein.

Таблица 1. Схема иммунизации коз производными морфина
Table 1. Immunization scheme of goats with morphine derivatives

Пол, возраст, масса	Вводимый антиген	Доза, мг/кг массы	Способ введения антигена		
			1-я инъекция	2-я инъекция	3-я инъекция
1. Коза (самка, 3 года)	КММ-БСА + ГСМ-БСА	0,3	Внутримышечно в 2 точки задних конечностей в физ. р-ре с ПАФ (1:1)	Внутримышечно в 2 точки передних конечностей в физ. р-ре с НАФ (1:1)	Подкожно в 2 точки в область шейных лимфоузлов в физ. р-ре с НАФ (1:1)
2. Коза (самка, 3 года)		0,1			

траметилбензидина (ТМБ, ООО «Абисенс», Россия). Оптическую плотность окрашенного продукта ферментативной реакции измеряли на планшетном мультимодальном ридере Feyond-A400 (“Allsheng”, Китай) при длине волны 450 нм. За величину титра принимали те разведения, при которых величина оптической плотности превышала соответствующие значения в контроле в три раза. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови и молоко неиммунной козы.

Вестерн-блот анализ

Образцы ФАМ-лиз (20 мкл, концентрация 2 мкг/мкл) смешивали с равным объемом 2× буфера Лэммли (125 мМ Tris-HCl, pH=6,8, 4% SDS, 20% глицерин, 5% 2-меркаптоэтанол, 0,04% бромфеноловый синий) и денатурировали при 95°C в течение 5 мин. Электрофоретическое разделение проводили в геле Mini-Protean TGX, Any kD (“BioRad”, США) с использованием трис-глицинового буфера (25 мМ Tris-OH, 250 мМ глицин, 0,1% SDS). В качестве (-) контроля использовали коммерческий препарат бетта-эндорфина человека (Sigma-Aldrich) в той же концентрации.

Перенос белков на PVDF-мембрану (“BioRad”, США) осуществляли методом полусухого трансфера при 1,3 мА/см² в течение 10 мин. После переноса мембрану трижды промывали PBST (PBS с 0,1% Tween-20) по 5 мин. Для детекции конъюгата ФАМ-лиз. мембрану инкубировали 30 мин при 25°C с первичными антителами козы, используя сыворотку крови в разведении 1:2000. После отмывки в PBST

(3×5 мин) мембрану обрабатывали вторичными антителами — антивидовой конъюгат Monoclonal Anti-Goat Antibody +Ph (Sigma-Aldrich) в разведении 1:5000 в течение 30 мин при комнатной температуре. Избыток вторичных антител удаляли тремя циклами промывки PBST по 5 мин.

Сигнал визуализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата ECL (“BioRad”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Регистрацию и анализ сигналов проводили на системе геле-документирования ChemiDoc MP (“BioRad”, США) в режиме «Chemi High Resolution» с накоплением сигнала. (Примечания: все этапы выполнены в технических повторях; контроль специфичности сигнала подтвержден использованием отрицательных контролей; условия обработки данных (например, экспозиция) оптимизированы для минимизации фонового шума).

Результаты и их обсуждение

В ходе выполнения работы были подобраны оптимальные условия для постановки «непрямого» метода ИФА. Концентрации антигена — ФАМ-лиз. для адсорбции на твердой фазе составила 5 мкг/мл, разведение антивидового конъюгата — 1:5000.

Тестирование сывороток коз «непрямым» методом ИФА на 42-й день от начала иммунизации показало, что специфические антитела к морфину вырабатываются после цикла иммунизации приблизительно в одинаковых титрах 5×10^{-5} – $4,5 \times 10^{-5}$ (рис. 2), несмотря на различия в дозах вводимого антигена (0,3 и 0,1 мг/кг массы). Надо от-

метить, что через 2 мес. всего лишь после одной бустерной инъекции титр антител в сыворотке крови резко возрос и составил 2×10^{-6} . Анализ молока на содержание антител к морфину показал, что после первого цикла иммунизации антитела обнаружива-

ются в невысоких титрах — 3×10^{-3} . В результате бустерной инъекции титр антител в молоке повысился до 3×10^{-4} (рис. 3).

Проверка специфичности козьих антител, полученных к двум дериватам морфина: КММ и ГСМ, конъюгированным

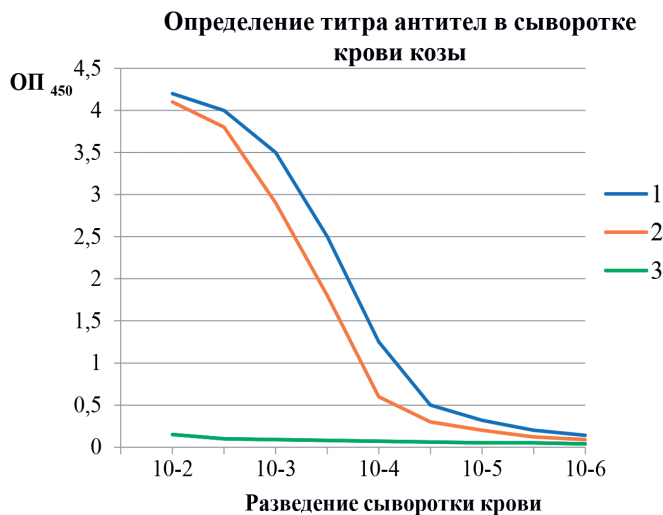


Рис. 2. Титры антисывороток коз, иммунизированных суммарным антигеном КММ-БСА + ГСМ-БСА на 42-й день от начала иммунизации: 1 — доза антигена 0,3 мг/кг, 2 — доза антигена 0,1 мг/кг, 3 — сыворотка крови неиммунной козы.

Fig. 2. Antiserum titers of goats immunized with the total antigen of KMM-BSA + GSM-BSA: 1 — antigen dose 0.3 mg/kg, 2 — antigen dose 0.1 mg/kg, 3 — blood serum of a nonimmune goat.

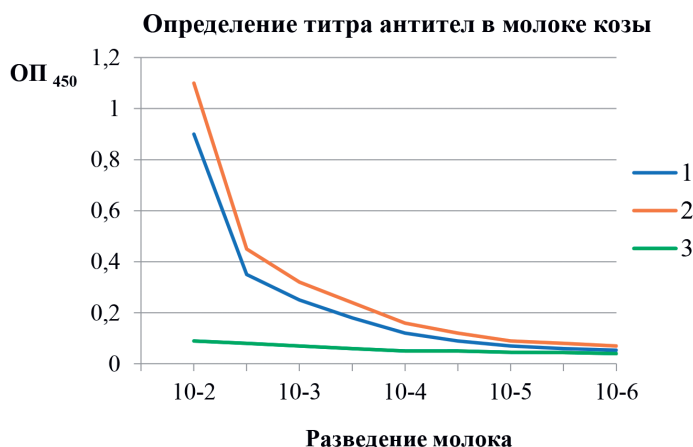


Рис. 3. Титры антител в молоке коз, иммунизированных суммарным антигеном КММ-БСА + ГСМ-БСА после бустерной инъекции: 1 — доза антигена 0,3 мг/кг, 2 — доза антигена 0,1 мг/кг, 3 — молоко неиммунной козы.

Fig. 3. Antibody titers in the milk of goats immunized with the total antigen of KMM-BSA + GSM-BSA: 1 — a dose of 0.3 mg/kg antigen, 2 — a dose of 0.1 mg/kg antigen, 3 — milk from a nonimmune goat.

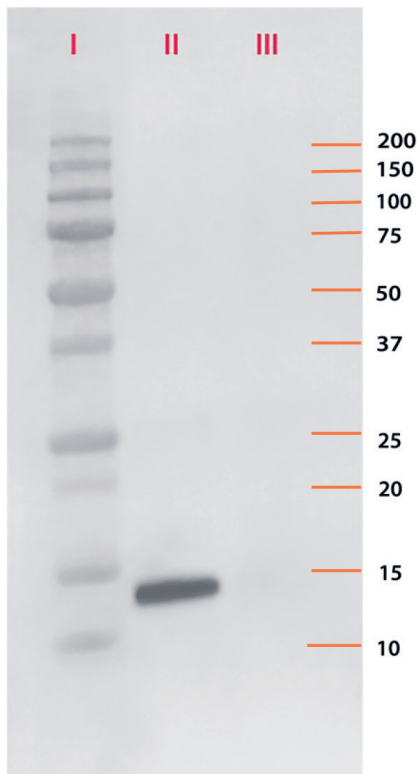


Рис. 4. Определение специфичности АТ1-М козы к морфину с помощью метода Вестерн-блот. Дорожка 1 — маркеры молекулярного веса, 2 — взаимодействие антител АТ1-М козы с ФАМ-лизоцим, 3 — (-) контроль.

Fig. 4. Determination of the specificity of АТ1-М goat to morphine using the Western blot method. Track 1 — molecular weight markers, 2 — interaction of goat АТ1-М antibodies with PHAM-lysozyme, 3 — (-) control.

с БСА с помощью метода Вестерн-блот, показала, что антитела специфически реагируют с третьим производным морфина — ФАМ, конъюгированным с лизоци-

мом. Положительная реакция — полоска на дорожке II в области, соответствующей молекулярной массе 14 кДа.

В результате проведенной работы от каждой козы в среднем было получено около 250 мл реиммунной сыворотки крови с титром антиморфиновых антител 2×10^{-6} для последующего препаративного выделения иммуноглобулинов. Полученные данные позволяют сделать вывод об эффективности использования коз в качестве продуцентов специфических антител к дериватам морфина.

Закключение

Многое, несмотря на тысячелетия применения морфина в клинической практике, остается непонятным и сегодня. Известно, например, что героин, или диацетилморфин (ДАМ) — самый опасный наркотик и самый мощный противокашлевый препарат. Другие дериваты морфина в той или иной степени ему уступают. В то же время появляются антитела к морфину, которые по определению должны нейтрализовать его действие. Парадокс заключается в том, что эти антиморфиновые антитела рекомендуются в качестве эффективных противокашлевых средств, т.е., блокируя действие морфия на кашлевой центр, они должны препятствовать противокашлевому действию.

В качестве примера можно привести ренгалин, разрешенное к медицинскому применению средство. В его составе аффинно-очищенные антитела к морфину, гистамину, брадикинину по 10000 ЕМД. Единственное указание по его применению — «проти-

Таблица 2. Продукция специфических антител к дериватам морфина у экспериментальных коз
Table 2. Production of specific antibodies to morphine derivatives in experimental goats

Животные	Титр антител			
	в сыворотке крови		в молоке	
	на 42-й день от начала иммунизации		на 115-й день от начала иммунизации (после бустерной инъекции)	
Коза № 1	5×10^{-5}		3×10^{-3}	
Коза № 2	$4,5 \times 10^{-5}$		$2,5 \times 10^{-3}$	

вокашлевое средство». Другой препарат, также разрешенный к применению, — пропротен-100, содержащий антитела к «мозгоспецифическому» белку S100 и показанный для уменьшения влечения к алкоголю, снижению рецидивов алкоголизма и т.д. Напомним, что члены семейства генов S100 участвуют в экспрессии иммунного гомеостаза, эпигенетических механизмах, апоптозе клеток, пролиферации, процессах воспаления и т.д. Подвид S100 В вырабатывается астроцитами и выполняет нейротрофическую функцию. Не касаясь полярных по отзывам оценок врачей и пациентов об эффективности иммунотерапии антителами ренгалина, пропротена и др., отметим лишь, что механизмы их целевого специфического действия весьма далеки от понимания даже на сегодняшний день.

Одно из ключевых достижений зарубежных исследователей — создание высокоаффинных моноклональных антител (mAb) против фентанила и аналогов. В 2023 году сообщено о полностью человеческом mAb CSX-1004 с пикомолярным средством к фентанилу. В экспериментах на мышах это антитело успешно отменило действие фентанила — как его анальгезию, так и опасную дыхательную депрессию от карфентанила. В исследованиях на обезьянах антитело защитило животных от повторных введений смертельных доз фентанила в течение 3–4 недель. При этом эффективность проявлялась без влияния на действие других опиоидов, например оксикодона. Эти данные демонстрируют принципиальную возможность использовать антитела для купирования передозировки опиоидов и профилактики рецидивов в течение длительного времени. Препарат CSX-1004 уже считается «клинически готовым» кандидатом и получил статус ускоренной разработки (Fast Track) Управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарствами (FDA) [11]. Начальные испытания на людях показали его переносимость без се-

рьезных побочных эффектов [10], что открывает путь к полноценным клиническим исследованиям.

Помимо фентанила, разрабатываются антитела и против других опиоидов. Например, исследуются моноклональные антитела, способные связывать героин и его активные метаболиты. В эксперименте на крысах вакцинация, индуцирующая антитела к героину/морфину, значительно снижала эффект героина: вакцина ослабляла анальгезию и эйфорию, сдвигая кривую дозового ответа вправо (снижение активности героина ~5-кратно). При этом специфичность антител была такова, что действие морфина как отдельного вещества практически не блокировалось [12]. Это важный момент: узкая специфичность позволяет, в случае необходимости, использовать альтернативные опиоиды для обезболивания пациента, даже если он иммунизирован против какого-либо конкретного опиоида (например, героина).

Насколько же такие подходы внедрены в практику? На сегодняшний день пассивная иммунотерапия опиоидной зависимости и передозировки находится на стадии исследований. В клинической практике еще нет зарегистрированных препаратов антител к наркотикам, но результаты доклинических работ обнадеживают. Преимущество антител — длительное действие. В отличие от налоксона, который быстро выводится, введение высокоаффинного IgG может обеспечивать недельную и более защиту от действия наркотика.

Важно отметить, что концепция иммунонейтрализации опиоидов разрабатывалась и ранее, но современный этап (2013–2023 гг.) характеризуется появлением технологий полностью человеческих антител, полученных, например, с помощью иммунизации трансгенных животных с человеческим репертуаром IgG [9]. Это позволяет избежать проблем иммуногенности,

присущих антителам из мышцы или других животных при применении у человека.

В нашей стране пассивная иммунизация широко используется в лечении инфекционных болезней и для нейтрализации различных ядов. В основном для этих целей используются антисыворотки и иммуноглобулины лошади. Недавно в нашей стране был разработан метод пассивной иммунизации против вируса Эбола с помощью козьих антител, нейтрализующих вирус. Испытания на добровольцах показали, что препараты иммуноглобулинов козы безвредны, апиrogenны, нетоксичны для печени и почек человека, а также не обладают иммуносупрессивным действием [5].

Биологическая активность полученных нами ранее кроличьих и свиных антител к двум производным морфина проверялась на клеточной культуре глиобластомы T98G, экспрессирующей опиоидные μ -рецепторы в высокой плотности. Было показано, что добавление морфина в культуральную

среду приводит к усилению синтеза ДНК в клетках и увеличению пролиферации. При этом внесение антиморфиновых антител отменяло действие морфина аналогично действию налоксона, что служило доказательством антагонистических свойств антител по отношению к μ -опиоидным рецепторам [2]. Несомненно, проверка биологической активности антиморфиновых антител должна проводиться несколькими методами. Например, с целью изучения влияния антител к морфину на опиоидную и дофаминергическую систему необходимо проведение поведенческих тестов на лабораторных животных. Эксперименты с использованием трансгенных гуманизированных мышей, полученных в НЦБМТ ФМБА России, могли бы приблизить нас к пониманию процессов в организме человека под действием антиморфиновых антител, а также сделать выводы об эффективности их применения в иммунотерапевтических целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Берзина А.Г., Ульянова Л.И., Гамалея Н.Б., Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д. Изучение иммунного ответа у мини-свиней светлогорской популяции к двум производным морфина. *Биомедицина*. 2018;2:15–21. [Berzina A.G., Ulyanova L.I., Gamaleya N.B., Stankova N.V., Kapanadze G.D. Isuchenie immunogo otveta u mini-sviney svetlogorskoy populacii k dvum proizvodnim morfina [The study of the immune response in mini-pigs of the Svetlogorsk population to two morphine derivatives]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2018;2:15–21. (In Russian)].
2. Берзина А.Г., Ульянова Л.И., Гамалея Н.Б., Климова Т.А., Трофимов А.В., Станкова Н.В. Особенности биологических свойств первичных, антиидиотипических и третичных антител к производным морфина, полученных в ксеногенных системах. *Российский иммунологический журнал*. 2019;13(22)(2–3):162–165. [Berzina A.G., Ulyanova L.I., Gamaleya N.B., Klimova T.A., Trofimov A.V., Stankova N.V. Osobennosti biologicheskikh svoystv pervichnih, antiidiotipicheskikh i treticheskikh anitel k proizvodnim morfina, poluchennih v ksenogennoy sistemah [Features of biological properties of primary, anti-idiotypic and tertiary antibodies to morphine derivatives obtained in xenogenic systems]. *Russian Journal of Immunology*. 2019;13(22)(2–3):162–165. (In Russian)].
3. Берзина А.Г., Ульянова Л.И., Савина М.А., Буркова А.А. Влияние антиидиотипических антител к морфину на особенности поведения вакцинированных крыс в эксперименте с применением препарата наночастиц из тритерпеноидов бересты в качестве адьюванта. *Вопросы наркологии*. 2023;35(3):85–97. [Berzina A.G., Ulyanova L.I., Savina M.A., Burkova A.A. Vliyanie antiidiotipicheskikh antitel k morfinu na osobennosti povedenia vaktsinirovannih kris v eksperimente s primeneniem preparata nanochastits iz triterpenoidov beresty v kachestve adyuvanta [The effect of antiidiotypic antibodies to morphine on the behavior of vaccinated rats in an experiment using a preparation of nanoparticles from birch bark triterpenoids as an adjuvant]. *Voprosi narkologii [Journal of Addiction Problems]*. 2023;35(3):85–97. (In Russian)].
4. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Шестаков К.А., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Фокин Ю.В. Иммуноген для лечения и профилактики зависимости от опиатов. Патент РФ № 2548802, опублик. 20.04.2015. [Gamaleya N.B., Berzina A.G., Shestakov K.A., Kapanadze G.D., Revjakin A.O.,

- Fokin Ju.V. *Immunogen dlya lecheniya i profilaktiki zavisimosti ot opiatov* [Immunogen for treating and preventing opiate addiction]. Patent RU No. 2548802, publ. 20.04.2015. (In Russian)].
5. Zubavichene N.M. *Получение и изучение свойств козьих и овечьих лечебно-профилактических иммуноглобулинов против болезни Эбола*. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. 2001. [Zubavichene N.M. *Poluchenie i izuchenie svoystv koz'ih i oveh'ih lechebno-profilakticheskikh immunoglobulinov protiv bolezni Ebola* [Obtaining and studying the properties of goat and sheep therapeutic and prophylactic immunoglobulins against Ebola disease]. Avtoref. diss. ... cand. biol. sci. 2001. (In Russian)].
 6. Ищенко А.М., Кудлинг Т.В., Сергеев В.Е., Трофимов А.В., Гамалея Н.Б., Ульянова Л.И., Берзина А.Г. *Моноклональные антитела 6G1 к производным морфина*. Патент РФ № 2703494, опубли. 18.10.2019, бюллетень № 29. [Ishchenko A.M., Kudling T.V., Sergeev V.E., Trofimov A.V., Gamaleya N.B., Ulyanova L.I., Berzina A.G. *Monoklonalnie antitela 6G1 k proizvodnim morfina* [6G1 monoclonal antibodies to morphine derivatives]. Patent RU No. 2703494, publ. 18.10.2019, bull. No. 29. (In Russian)].
 7. Ищенко А.М., Кудлинг Т.В., Сергеев В.Е., Трофимов А.В., Гамалея Н.Б., Ульянова Л.И., Берзина А.Г. *Моноклональные антитела 3K11 к производным морфина*. Патент РФ № 2702002, опубли. 03.10.2019, бюллетень № 28. [Ishchenko A.M., Kudling T.V., Sergeev V.E., Trofimov A.V., Gamaleya N.B., Ulyanova L.I., Berzina A.G. *Monoklonalnie antitela 3K11 k proizvodnim morfina* [3K11 monoclonal antibodies to morphine derivatives]. Patent RU No. 2702002, publ. 03.10.2019, bull. No. 28. (In Russian)].
 8. Каркищенко В.Н., Берзина А.Г., Климова Т.А., Гамалея Н.Б., Агельдинов Р.А., Кузнецов А.Е., Корсун И.С., Нестеров М.С., Ульянова Л.И. *Формирование, характеристика и in vivo тестирование липосомированных антиидиотипических антител к производным морфина*. *Биомедицина*. 2021;17(4):8–17. [Karkischenko V.N., Berzina A.G., Klimova T.A., Gamaleya N.B., Ageldinov R.A., Kuznetsov A.E., Korsun I.C., Nesterov M.S., Ulyanova L.I. *Formirovanie, harakteristika in vivo testirovanie liposomirovannih antiidiotipicheskikh antitel k proizvodnim morfina* [Preparation, characterization, and preliminary in vivo testing of liposomated antiidiotypic antibodies against morphine derivatives]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2021;17(4):8–17. (In Russian)].
 9. Bremer P.T., et al. Investigation of monoclonal antibody CSX-1004 for fentanyl overdose. *Nature Communications*. 2023;14(1):7700.
 10. Gallant J.P., et al. Identification and biophysical characterization of a novel domain-swapped camelid antibody specific for fentanyl. *Journal of Biological Chemistry*. 2024;300(8):107502. DOI: 10.1016/j.jbc.2024.107502.
 11. Schwienteck K.L., et al. Effectiveness and selectivity of a heroin conjugate vaccine to attenuate heroin, 6-acetylmorphine, and morphine antinociception in rats: Comparison with naltrexone. *Drug and alcohol dependence*. 2019;204:107501.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Берзина Ася Григорьевна*, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: berzina07@mail.ru

Исмаилова Диана Хусейновна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ismailovadk@scbmt.ru

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

Asya G. Berzina*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: berzina07@mail.ru

Diana K. Ismailova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ismailovadk@scbmt.ru

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

Савина Мария Анатольевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: graff22@mail.ru

Maria A. Savina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: graff22@mail.ru

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

e-mail: niknik2808@yandex.ru

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

e-mail: niknik2808@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИАЛЬФА-СТАФИЛОЛИЗИНА В ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ, ОСАДКЕ II+III И ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ ПРЕПАРАТАХ

Е.В. Росина*, Е.Н. Калинина, С.Е. Зиганшина, Е.А. Коновалова, Е.С. Кормщикова

*ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии
и переливания крови ФМБА России»*

610027, Российская Федерация, Кировская обл., Киров, Красноармейская ул., 72

Для комплексного лечения стафилококковой инфекции применяют иммуноглобулины нормальный или противостафилококковый, иммуноспецифическую плазму, эффективность которых зависит от концентрации антиальфа-стафилолизина. Показатель определяют в готовых иммуноглобулиновых препаратах и в плазме, используемой для их получения. В ходе производственного процесса также важно оценивать специфическую активность осадка II+III. Существующая методика определения антиальфа-стафилолизина предназначена для контроля качества плазмы человека для фракционирования, иммуноглобулинов человека нормального и специфического. Информация о ее применении для тестирования осадка II+III отсутствует. Актуальной задачей является повышение точности и расширение области применения методики определения антиальфа-стафилолизина для тестирования фракции II+III. Цель работы состояла в модификации методики определения антиальфа-стафилолизина в плазме человека для фракционирования, осадке II+III и иммуноглобулиновых препаратах. Специфическую активность оценивали в соответствии с ОФС.1.8.2.0008.15. В ходе модификации определен диапазон значений оптической плотности при установлении лимита гемолитического действия токсина. Подобраны условия анализа осадка II+III. Предложена схема разведения образцов с дискретностью 1 МЕ/мл. Доказана специфичность выявления антител, подтверждены сходимост, линейност и правильност модифицированной методики. Модификация методики расширила область ее применения за счет тестирования осадка II+III, повысила точност оценки путем снижения дискретности определения и исключения субъективности визуальной оценки при определении лимита гемолитического действия токсина. Подтверждены пригодност модифицированной методики для контроля качества сырья и готовой продукции.

Ключевые слова: антиальфа-стафилолизин, специфическая активность, плазма человека для фракционирования, осадок II+III, иммуноглобулин человека

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА России на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124032600075-0), без спонсорской поддержки.

Для цитирования: Росина Е.В., Калинина Е.Н., Зиганшина С.Е., Коновалова Е.А., Кормщикова Е.С. Модификация методики определения антиальфа-стафилолизина в плазме человека для фракционирования, осадке II+III и иммуноглобулиновых препаратах. *Биомедицина*. 2025;21(2):27–36. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-27-36>

Поступила 07.03.2025

Принята после доработки 07.04.2025

Опубликована 10.06.2025

MODIFICATION OF DETERMINATION METHOD FOR STAPHYLOCOCCUS ALPHA ANTITOXIN IN HUMAN PLASMA FOR FRACTIONATION, II + III PRECIPITATE AND IMMUNOGLOBULIN PREPARATIONS

Elena V. Rosina*, Elena N. Kalinina, Svetlana E. Ziganshina,
Ekaterina A. Konovalova, Elena S. Kormschikova

*Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
610027, Russian Federation, Kirov Region, Kirov, Krasnoarmeyskaya Str., 72*

Complex treatment of staphylococcal infection is carried out using normal immunoglobulins, antistaphylococcal immunoglobulin, and immunospecific plasma. Their effectiveness depends on the concentration of staphylococcus alpha antitoxin. This indicator is determined in immunoglobulin preparations and in the plasma used for their production. During the production process, the potency of the intermediate – II+III precipitate – should be precisely evaluated. The existing method for determining staphylococcus alpha antitoxin is intended for monitoring the quality of plasma for fractionation, determination of normal and specific human immunoglobulins. The information about the possibility of its use for testing II+III precipitate is currently lacking. The task of increasing the accuracy and extending the application scope of the existing method for determining staphylococcus alpha antitoxin for testing II + III precipitate appears highly relevant. In this study, we aimed to modify the method for determining staphylococcus alpha antitoxin in plasma for fractionation, II+III precipitate and immunoglobulin preparations. The assessment of the potency was carried out in accordance with Pharmacopoeia. The method of quantitative determination of staphylococcus alpha antitoxin in human plasma for fractionation, II+III precipitate and ready-made immunoglobulin preparations was modified. The range of optical density values at the stage of setting the limit of the hemolytic effect of the toxin was determined. The conditions for testing II+III precipitate were selected. A dilution scheme of the samples with a discreteness of 1 IU/ml was proposed. The specificity of antibody detection in samples was confirmed. The convergence linearity and correctness of the modified method was established. The implemented modification of the method extended the scope of its application due to the possibility of testing II+III precipitate. The accuracy of assessing the content of staphylococcus alpha antitoxin was increased by reducing the discreteness of determination and eliminating the subjectivity of visual assessment of the limit of the hemolytic action of the toxin. The result of determination of metrological characteristics showed the suitability of the modified method for quality control of raw materials and finished products.

Keywords: antialphastaphylolysin, specific activity, human plasma for fractionation, II+III precipitate, human immunoglobulin

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

Funding: the work was carried out according to the state assignment of the Federal Medical and Biological Agency of Russia to conduct applied scientific research (No. 124032600075-0).

For citation: Rosina E.V., Kalinina E.N., Ziganshina S.E., Konovalova E.A., Kormschikova E.S. Modification of Determination Method for Staphylococcus Alpha Antitoxin in Human Plasma for Fractionation, II + III Precipitate and Immunoglobulin Preparations. *Journal Biomed.* 2025;21(2):27–36. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-27-36>

Submitted 07.03.2025

Revised 07.04.2025

Published 10.06.2025

Введение

Золотистый стафилококк относится к наиболее распространенным бактериальным патогенам человека и вызывает множество заболеваний, поражающих различные органы и ткани. Он является одной из основных причин внутрибольничных инфекций, требующих хирургических вмешательств при развитии гнойных осложнений, инфицирования протезов и катетеров, возникновения тяжелых септических состояний. Указанный возбудитель относится к высоколетальным патогенам со смертностью до 18% в благополучных странах и до 27% — в развивающихся [3]. Известно, что данный микроорганизм вырабатывает несколько видов экзопродуктов с выраженными токсическими свойствами. Среди них наибольшее значение имеет гемолитический α -токсин. Связываясь с мембранными рецепторами и образуя поры в мембране, α -токсин разрушает множество клеток организма хозяина, включая эритроциты, моноциты, макрофаги, лимфоциты. Его синтез, как правило, является причиной тяжелого течения заболевания [12].

Для лечения стафилококковых инфекций используют различные противомикробные средства. При поверхностных поражениях кожи достаточно обработки поврежденных участков антисептиками и топическими антибактериальными препаратами [6]. Для специфической иммунотерапии острой и хронической инфекции, а также ее профилактики проводят вакцинацию стафилококковым анатоксином [5]. В настоящее время основным средством лечения данной патологии являются антибиотики. В комплексной терапии тяжелых форм заболеваний, в т. ч. септических осложнений, помимо них применяют иммунную плазму и иммуноглобулины человека нормальный или специфический, которые содержат антитела, нейтрализующие токсины и ускоряющие процессы опсонизации и бактериолиза [1, 9–11, 13, 14]. Кроме того,

перечисленные лекарственные средства эффективны против штаммов стафилококка, обладающих лекарственной устойчивостью к антибиотикам, а их эффективность напрямую зависит от специфической активности (СА) — концентрации антител к α -токсину стафилококка (антиальфа-стафилолизина).

При получении иммуноглобулинов контролируют СА плазмы для фракционирования и готовых препаратов. Контроль содержания антиальфа-стафилолизина в промежуточном продукте — осадке II+III — не предусмотрен. Вместе с тем его проведение позволит оценить степень концентрирования целевых антител в процессе производства и их стабильность при длительном хранении фракции.

Государственная Фармакопея Российской Федерации содержит общую фармакопейную статью (ОФС.1.8.2.0008.15), описывающую методику определения содержания антиальфа-стафилолизина в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных. Она определяет порядок оценки концентрации специфических антител в плазме для фракционирования, в иммуноглобулинах человека нормальном и специфическом [7]. Возможность ее применения для оценки СА осадка II+III не предусмотрена. Кроме того, существует ряд недостатков методики, из-за которых снижается точность определения концентрации антител. К ним можно отнести визуальную оценку степени гемолиза при определении лимита гемолитического действия токсина, что затрудняет приготовление рабочего раствора. Также следует отметить недостаточную точность определения концентрации антител выше 10 МЕ/мл: порядок приготовления разведений исследуемого образца в интервале от 10 до 14 МЕ/мл отсутствует, а дискретность методики достаточно высока и равна 2 МЕ/мл. В связи с этим актуальной задачей является повышение точности определения антиальфа-стафилолизина в плазме для фракционирования и готовых

иммуноглобулиновых препаратах, а также возможность тестирования осадка II+III.

Цель настоящего исследования состояла в модификации методики определения содержания антиальфа-стафилолизина в плазме человека для фракционирования, осадке II+III и готовых иммуноглобулиновых препаратах.

Материалы и методы

Исследуемые образцы: пулы антистафилококковой плазмы человека для фракционирования ($n=17$); образцы осадка II+III, полученные путем холодового фракционирования по методу Кона ($n=5$); концентраты противостафилококковых антител ($n=5$); готовые препараты иммуноглобулина человека нормального для внутривенного и внутримышечного введения ($n=5$).

Применяли набор реагентов для определения уровня антиальфа-стафилолизина в сывороточных препаратах крови человека и животных «Токсин стафилококковый диагностический» (филиал «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) и фармакопейный стандартный образец содержания антиальфа-стафилолизина ФСО 3.1.00342 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России).

Для проведения исследований использовали следующее оборудование: инкубатор лабораторный общего назначения Shellad модели G 112-2 (“Sheldon”, США), центрифуги Heraeus Megafuga 16 (“Thermo Fisher Scientific”, США) и MiniSpin (“Eppendorf AG”, Германия), колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2-УХЛ (АО «Загорский оптико-механический завод», Россия).

Концентрацию специфических антител оценивали в реакции нейтрализации гемолитических свойств стафилококкового α -токсина согласно ОФС.1.8.2.0008.15 «Определение содержания антиальфа-стафилолизина (специфических антител) в ле-

карственных препаратах из сыворотки крови человека и животных» [7].

Среднее значение представляли в виде медианы или среднего арифметического. Разброс данных характеризовали размахом варьирования (диапазоном от максимума до минимума) или стандартным отклонением. Оценивали специфичность методики, прецизионность в условиях сходимости и линейность. Степень зависимости между аналитическим сигналом и определяемой характеристикой оценивали по коэффициенту детерминации линейной регрессии.

Сравнительный анализ полученных данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента (t-test), предварительно оценив характер распределения показателя с помощью критерия Шапиро — Уилка. При уровне значимости $p>0,05$ распределение исследуемого признака признавали нормальным. Различия считали значимыми при $p<0,05$ [4].

При оценке метрологических характеристик модифицированной методики установили следующие критерии приемлемости: прецизионность — размах варьирования СА не должен превышать шаг титрования методики, линейность — коэффициент детерминации не менее 0,98, правильность — номинальные значения специфической активности модельных смесей, приготовленных из ФСО 3.1.00342, с различным содержанием антиальфа-стафилолизина, должны находиться в диапазоне размаха варьирования полученных результатов [8].

Результаты и их обсуждение

Консервирование крови кролика

Для определения концентрации антиальфа-стафилолизина фармакопейная методика предусматривает взятие крови кролика в р-р Олсвера в соотношении 1:1. Однако при хранении крови, отобранной таким образом, в первые сутки наблюдался достаточно сильный гемолиз, образовывались сгустки. В связи с этим приняли решение уменьшить концентрацию эритроцитов,

смешав кровь кролика и р-р Олсвера в соотношении 1:10, и сравнить сохранность эритроцитов, отобранных двумя способами. Кровь трех кроликов-доноров заготовили обоими способами и хранили при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение 1 мес. На 1, 7, 14, 21 и 28 сут хранения отбирали пробу, центрифугировали в течение 10 мин при скорости вращения 1500 об/мин и измеряли значение ОП надосадочной жидкости при длине волны 400 нм и толщине оптического слоя 1 мм. Измерения проводили трехкратно, полученные результаты представлены на рис. 1.

При соотношении крови кролика и р-ра Олсвера 1:1 наблюдался более интенсивный гемолиз: в 1 сут хранения показатель превышал среднее значение для контроля спонтанного лизиса эритроцитов ($t\text{-test: } p=0,16\times 10^{-5}$). При меньшей концентрации эритроцитов подобный эффект отмечен спустя 14 сут хранения ($t\text{-test: } p=0,04$). При сравнении динамики гемолиза установлено, что в конце срока наблюдения ОП надосадочной жидкости возросла более чем в 3 раза (до значения $0,27\pm 0,02$) при консервировании эритроцитов р-ром Олсвера в соотношении 1:1 и менее чем в 2 раза (до уровня $0,09\pm 0,01$) при соотношении 1:10. На основании полученных данных выявлено, что предпоч-

тительно отбирать кровь кролика в р-р Олсвера в соотношении 1:10 и использовать ее в течение двух недель.

Определение лимита гемолитического действия токсина

Одним из этапов фармакопейной методики является установление лимита гемолитического действия стафилококкового токсина (Lh), т.е. такого его количества, которое связывается с 1 МЕ/мл антиальфа-стафилолизина и вызывает почти полный гемолиз эритроцитов кролика. При этом его степень принято оценивать визуально. Интерпретация результатов достаточно субъективна и может негативно влиять на точность определения. В связи с этим на данном этапе, помимо визуальной оценки степени гемолиза, измеряли ОП надосадочной жидкости после центрифугирования реакционной смеси. Использовали данный подход для 10-ти определений лимита гемолитического действия токсина. Полученные результаты позволили установить диапазон значений ОП, соответствующий почти полному гемолизу эритроцитов — от 0,40 до 0,48. Количество токсина, приводящее к изменению ОП в таком диапазоне, принимали за лимит гемолитического действия и использовали для приготовления рабочего раствора токсина (PPT).

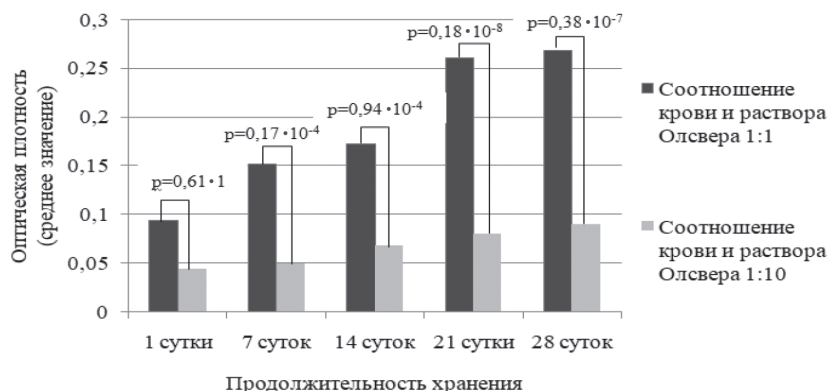


Рис. 1. Сохранность эритроцитов кролика при консервировании р-м Олсвера в соотношениях 1:1 и 1:10.
Fig. 1. Preservation of rabbit erythrocytes when preserving with Olsver solution in ratios of 1:1 and 1:10.

Таблица 1. Модифицированная схема разведения испытуемого образца

Table 1. Modified scheme of sample dilution

Номер пробирки	Предполагаемое содержание антиальфа-стафилолизина, (МЕ/мл)	Разведение образца	Количество	
			исследуемого образца, мл	физ. р-ра, мл
1	0,2	0	0,50	0
2	0,5	1:2,5	0,50	0,75
3	1	1:5	1,50	6,00
4	2	1:10	0,5 (пробирка № 3)	0,50
5	3	1:15	0,25 (пробирка № 3)	0,50
6	4	1:20	0,25 (пробирка № 3)	0,75
7	5	1:25	0,25 (пробирка № 3) и т.д.	1,00 и т.д.

Приготовление разведений испытуемых образцов

Согласно методике, изложенной в ОФС. 1.8.2.0008.15, предлагается использование схемы разведения исследуемого образца с учетом предполагаемой концентрации антиальфа-стафилолизина. Содержание антител определяется в диапазоне от 1 до 10 МЕ/мл с шагом 1 МЕ/мл, выше 14 МЕ/мл — с шагом 2 МЕ/мл. Способ приготовления разведений в интервале от 10 до 14 МЕ/мл не предусмотрен. Для повышения точности оценки содержания антиальфа-стафилолизина скорректировали существующую схему разведения проб таким образом, чтобы дискретность определения составила 1 МЕ/мл (табл. 1).

Как видно из табл. 1, для приготовления разведений 1:15 и далее с шагом 1:5 использовали 0,25 мл р-ра из пробирки № 3. При этом с каждым последующим разведением объем физ. р-ра увеличивали на 0,25 мл. Данную схему разведения использовали для определения СА исследуемых образцов.

Оценка специфичности определения антиальфа-стафилолизина

Полученные значения СА в пулах антистафилококковой плазмы крови человека для фракционирования варьировали от 1 до 4 МЕ/мл. В пробирках с исходным образцом и с его разведениями 1:2,5 и 1:5 отметили неспецифический гемолиз эри-

троцитов, вероятно, связанный с наличием в плазме гемолизинов α и β , вызывающих разрушение эритроцитов при инкубации проб [2]. Для оценки влияния данного фактора на результаты определения антиальфа-стафилолизина сопоставили изменения ОП в разведениях плазмы с добавлением РРТ и с его заменой на физ. р-р (ФР) (рис. 2).

Неспецифический гемолиз наблюдался в исходной пробе плазмы и в ее разведениях 1:2,5 и 1:5 с добавлением ФР и РРТ, значения ОП превышали 0,3 оптических единицы. На графике для плазмы с добавлением ФР значения ОП снижались с увеличением разведения и приближались к среднему значению для контроля спонтанного лизиса эритроцитов, равного $0,045 \pm 0,013$. Следовательно, неспецифический гемолиз начиная с разбавления 1:15 практически отсутствовал. Для кривой зависимости ОП от разведения пробы плазмы с добавлением РРТ наблюдался перегиб. В разведении 1:10 степень лизиса эритроцитов — менее 50%. Увеличение значений ОП пробы с разведения 1:15 и выше обусловлено гемолитическим действием токсина. По нашему мнению, при определении содержания альфа-стафилолизина измерение ОП образцов плазмы в разведении 1:5 и менее неинформативно, т.к. гемолиз в них неспецифический. Кроме того, для оценки специфичности рекомендуется готовить три разведения — 1:5, 1:10 и 1:15, в которых РРТ

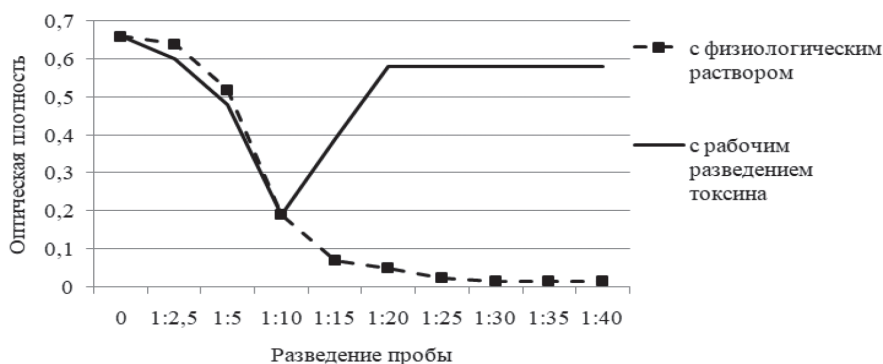


Рис. 2. Оценка неспецифического гемолиза эритроцитов в пулах плазмы человека для фракционирования.
Fig. 2. Assessment of nonspecific hemolysis of erythrocytes in human plasma for fractionation.

заменен на ФР. Сравнение степени гемолиза в данных разведениях с РРТ и без него позволит сделать вывод о специфичности.

Осадок II+III представляет собой твердую субстанцию, которая в замороженном состоянии крошится при механическом воздействии, а при комнатной температуре размягчается и становится вязкой. Одной из задач данного исследования являлся подбор пробоподготовки таких образцов для оценки их СА. Суспензию готовили с использованием ФР из расчета 1 мл ФР на 1 г осадка. Стоит отметить, что суспензии спустя 4–8 ч принимали желеобразную консистенцию, поэтому определение их СА проводили сразу после пробоподготовки.

Для оценки специфичности гемолиза эритроцитов суспензии осадка II+III разводили в соответствии с табл. 1, начиная с разведения 1:5, куда вместо РРТ вносили ФР. Реакционную смесь инкубировали при 37°C и измеряли ОП. Полученные значения сравнивали с контролем спонтанного лизиса эритроцитов. Значения ОП составили при разведении 1:5 — 0,17, 1:10 — 0,10, в остальных случаях варьировали от 0,07 до 0,04. Увеличение значений ОП в разведениях 1:5 и 1:10 связано с мутностью суспензии, визуально самопроизвольный гемолиз в них не наблюдался. Не отмечено значимых различий

между ОП суспензии с разведениями более 1:15 и контроля спонтанного лизиса эритроцитов (t-тест: $p=0,11$), что подтверждает специфичность гемолиза эритроцитов, вызванного действием α -токсина стафилококка. При анализе суспензии осадка II+III допустимо исследовать разведения более 1:15, т.к. в них не наблюдается влияния мутности образца на аналитический сигнал.

Оценивали содержание антиальфа-стафилолизина в готовых препаратах иммуноглобулина человека, полученные значения варьировали от 3,0 до 8,0 МЕ/мл. В пробах с максимальным содержанием белка (от исходной и до разведения 1:10) визуально гемолиз эритроцитов не наблюдался, аналитический сигнал не отличался от контроля спонтанного лизиса эритроцитов (t-тест: $p=0,15$), значения которого составляли $0,045 \pm 0,013$. Полученные результаты свидетельствовали о специфичности гемолиза эритроцитов, опосредованного действием α -токсина стафилококка.

Оценка прецизионности, линейности и правильности модифицированной методики

Для оценки прецизионности методики в условиях сходимости исследовали плазму для фракционирования, суспензии осадка II+III, концентраты противостафилококко-

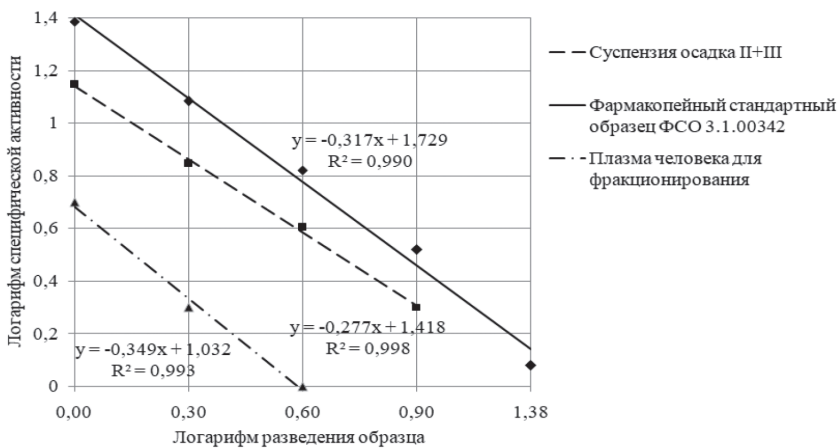


Рис. 3. Зависимость логарифма концентрации антиальфа-стафилолизина от логарифма разведения образца.
Fig. 3. Dependence the logarithm of concentration of staphylococcus alpha antitoxin on the logarithm of sample dilution.

вых антител и нормальный иммуноглобулин человека. Анализ каждого образца проводили трехкратно. Размах варьирования СА во всех сериях определений не превышал шаг титрования методики, это свидетельствовало об удовлетворительной сходимости результатов.

Для оценки линейности модифицированной методики анализировали последовательные двукратные разведения ФСО 3.1.00342, суспензии осадка II+III, плазмы для фракционирования. Затем строили кривые зависимости концентрации антиальфа-стафилолизина от разведения образцов в логарифмических координатах (рис. 3).

Значения коэффициентов линейной детерминации (R^2) варьировали от 0,990

до 0,998, что подтверждало линейность методики в диапазоне концентраций антиальфа-стафилолизина от 1 до 24 МЕ/мл.

Правильность модифицированной методики оценивали на основании результатов тестирования модельных смесей. Каждую смесь анализировали трехкратно. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Ожидаемые значения содержания антиальфа-стафилолизина в модельных смесях находились в пределах размаха варьирования полученных результатов. Это свидетельствовало о соответствии модифицированной методики критерию правильности в анализируемом диапазоне от 1,0 до 24,0 МЕ/мл.

Таблица 2. Оценка правильности модифицированной методики
Table 2. Assessment of the correctness of the modified method

Ожидаемое значение антиальфа-стафилолизина, МЕ/мл	Результат определения антиальфа-стафилолизина, МЕ/мл
24,0	24,0 (24,0–24,2)
12,0	12,0 (12,0–12,1)
6,0	6,0 (5,5–6,0)
3,0	3,0 (2,2–3,0)
1,0	1 (1,0–1,1)

Выводы

1. Модифицированная методика определения содержания антиальфа-стафилолизина предусматривает способ заготовки крови кролика-донора, обеспечивающий лучшую сохранность эритроцитов.

2. Установлен интервал значений ОП реакционной смеси на этапе определения лимита гемолитического действия токсина, что устраняет субъективность оценки результатов.

3. Схема разведения исследуемого образца позволяет более точно определять концентрацию антиальфа-стафилолизина с дискретностью 1 МЕ/мл.

4. Предложен порядок пробоподготовки для оценки специфической активности осадка II+III.

5. Доказана целесообразность анализа разведений плазмы человека для фракционирования от 1:5 и выше, для осадка II+III — разведений не менее 1:15.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Абаев И.В., Скрыбин Ю.П., Коробова О.В. и др. Сравнение гемолитической активности и генов гемолитических токсинов клинических штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных на территории РФ. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019;64(5):294–298. [Abaev I.V., Skryabin Yu.P., Korobova O.V., et al. Sravnenie gemoliticheskoy aktivnosti i genov gemoliticheskikh toksinov klinicheskikh shtammov *Staphylococcus aureus*, izolirovannykh na territorii RF [Comparison of hemolytic activity and hemolytic toxin genes of clinical strains of *Staphylococcus aureus* isolated in the Russian Federation]. *Clinical laboratory diagnostics*. 2019;64(5):294–298. (In Russian)]. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-5-294-298.
2. Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Михайлова Н.Л. и др. *Физиология крови*. Уч. пособ. к практическим занятиям по нормальной физиологии для студентов медицинского факультета. Ульяновск: УлГУ, 2017:58. [Abakumova T.V., Gening T.P., Mikhailova N.L., et al. *Fiziologiya krovi* [Physiology of blood]. Uch. posob. k prakticheskim zanjatijam po normalnoy fiziologii dlja studentov medicinskikh vusov [Textbook for practical classes in normal physiology for students of the Faculty of Medicine]. Ulyanovsk: UIGU, 2017:58. (In Russian)].
3. Буйлова И.А., Савкина М.В., Саяпина Л.В. и др. Оценка современного состояния фармацевтической разработки противостафилококковых профилактических препаратов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(4):560–572. [Builova I.A., Savkina M.V., Sayapina L.V., et al. Otsenka sovremennogo sostoyaniya farmatsevticheskoy razrabotki protivostafilokokkovykh profilakticheskikh preparatov. [Assessment of the current state of pharmaceutical development of anti-staphylococcal prophylactic drugs]. *Zurnal microbiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2024;101(4):560–572. (In Russian)]. DOI: 10.36233/0372-9311-512.
4. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика, 1998:459. [Glanz S. *Mediko-biologicheskaja statistika* [Medical and biological statistics]. Moscow: Praktika Publ., 1998:459. (In Russian)].
5. Инструкция по медицинскому применению препарата «Анатоксин стафилококковый адсорбированный». [Instrucciya po medicinskomu primeneniyu preparata “Anatoksin stafilocockovyj adsorbirovannyj”] [Instruction for medical use of the drug “*Staphylococcal anatoxin adsorbed*”].
6. Николаева И.В., Анохин В.А. Стафилококковые инфекции в педиатрии. *Практическая медицина*. 2010;1(40):24–27. [Nicolaeva I.V., Anochin V.A. Stafilococovye infekcii v pediatrii [Staphylococcal infections in pediatrics]. *Practicheskaya medicina* [Practical medicine]. 2010;1(40):24–27. (In Russian)].
7. Общая фармакопейная статья ОФС.1.8.2.0008.15 «Определение содержания антиальфа-стафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных». *Государственная Фармакопея Российской Федерации*. XIV изд. 2018;2:3183–3192. [Obshhaya farmacopejnaya statya OFS.1.8.2.0008.15 “Opredelenie soderzhaniya antialfästafilolisina (specificheskikh antitel) v lekarstvennykh preparatakh iz syvorotki krovi cheloveka i zhivotnykh”] [“Determination of the content of antialphastaphylolysin (specific antibodies) in medicinal preparations from human and animal blood serum”]. *Gosudarstvennaya Farmacopeya Rossijskoy Federacii* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV ed. 2018;2:3183–3192. (In Russian)].
8. Общая фармакопейная статья ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». *Государственная Фармакопея Российской Федерации*. XIV изд. 2018;1:276–288. [Obshhaya farmacopejnaya statya OFS.1.1.0012.15 “Validaciya analiticheskikh metodik”] [“Validation of analytical methods”]. *Gosudarstvennaya Farmacopeya Rossijskoy Federacii* [Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV ed. 2018;1:276–288. (In Russian)].
9. Скрипай Л.А., Вильянинов В.И., Бельгесов Н.В. Применение иммунной плазмы при лечении пациентов с бактериальными инфекциями и иммуносупрессией. *Вестник гематологии*. 2022;18(1):56. [Skripay L.A., Vilyaninov V.I., Belgesov N.V. Primenenie immunnoy plazmy pri lechenii pacientov

- s bacterialnymi infekciyami i immunosupressiyey [Use of immune plasma in the treatment of patients with bacterial infections and immunosuppression]. *Vestnik gematologii* [Bulletin of Hematology]. 2022;18(1):56. (In Russian)].
10. Фармакопейная статья ФС.3.3.2.0007.15 «Иммуноглобулин человека нормальный». *Государственная Фармакопея Российской Федерации*. XIV изд. 2018;2: 5758–5763. [Farmacopeynaya statya FS.3.3.2.0007.15 “Immunoglobulin cheloveka normalnyj” [“Normal human immunoglobulin”]. *Gosudarstvennaya Farmacopeya Rossijskoy Federacii* [Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV ed. 2018;2:5758–5763. (In Russian)].
11. Фармакопейная статья ФС.3.3.2.0009.19 «Иммуноглобулин человека противостафилококковый». *Государственная Фармакопея Российской Федерации*. XIV изд. 2018;2:5771–5775. [Farmacopeynaya statya FS.3.3.2.0009.19 “Immunoglobulin cheloveka protivostafilokokkovyj” [“Human anti-staphylococcal immunoglobulin”]. *Gosudarstvennaya Farmacopeya Rossijskoy Federacii* [Pharmacopoeia of the Russian Federation]. XIV ed. 2018;2:5771–5775. (In Russian)].
12. Clegg J., Soldaini E., McLoughlin R.M., et al. *Staphylococcus aureus* vaccine research and development: the past, present and future, including novel therapeutic strategies. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:705360. DOI: 10.3389/fimmu.2021.705360.
13. Francois B., Barraud O., Jafri H.S. Antibody-based therapy to combat *Staphylococcus aureus* infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23:219–221. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.02.035.
14. Kelly J. Immunotherapy against antibiotic-resistant bacteria: the Russian experience with an antistaphylococcal hyperimmune plasma and immunoglobulin. *Microbes and infection*. 2000;2:1383–1392. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01292-2.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Росина Елена Владимировна*, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России»;
e-mail: rosina@niigpk.ru

Elena V. Rosina*, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: rosina@niigpk.ru

Калинина Елена Николаевна, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России»;
e-mail: kalininaen@niigpk.ru

Elena N. Kalinina, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: kalininaen@niigpk.ru

Зиганшина Светлана Евгеньевна, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России»;
e-mail: ziganshina@niigpk.ru

Svetlana E. Ziganshina, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ziganshina@niigpk.ru

Коновалова Екатерина Анатольевна, ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России»;
e-mail: konovalovaea@niigpk.ru

Ekaterina A. Konovalova, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: konovalovaea@niigpk.ru

Кормщикова Елена Сергеевна, к.б.н., ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России»;
e-mail: kormschikova@niigpk.ru

Elena S. Kormschikova, Cand. Sci. (Biol.), Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: kormschikova@niigpk.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ИЗМЕНЕНИЕ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПОДКЛАССА IgG1 ЗА СЧЕТ ПОДБОРА УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ И ДОБАВОК

С.С. Тимонова^{1,*}, А.А. Полупанова¹, И.А. Кирик¹, О.А. Карпунина¹, А.А. Федоров¹,
Е.В. Зубарева¹, В.В. Мягкова², А.А. Пискунов¹, Р.А. Хамитов¹

¹ АО «ГЕНЕРИУМ»

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

² Eminence Scientific (Suzhou) Co., Ltd.

Китай, Цзянсу, Промышленный парк Сучжоу, ул. Сантянь, 218, 3F, 24

Возможность изменения профиля гликозилирования — важная опция при разработке технологии получения терапевтических рекомбинантных иммуноглобулинов. Гликаны обеспечивают влияние на различные эффекторные функции антитела, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и период полувыведения препарата. Способность достигнуть необходимого гликопрофиля терапевтического антитела за счет оптимизации условий культивирования будет способствовать как получению более эффективных препаратов, так и ускоренной разработке биоаналогов. По результатам проведенной работы установлено, что увеличение длительности культивирования приводит к снижению содержания галактоз; добавление регулятора афукоз EM-N-glycan regulator-2 (“Eminence”, Китай) приводит к увеличению афукозилированных гликанов; коэкспрессия фермента Fut8 приводит к увеличению маннозных остатков. Также были апробированы различные подходы, обеспечивающие регуляцию содержания фукоз, манноз и галактоз в ходе процесса биосинтеза терапевтического антитела IgG1.

Ключевые слова: культура клеток CHO, профиль гликозилирования, рекомбинантные белки, терапевтические антитела

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работы финансированы АО «ГЕНЕРИУМ».

Благодарности: авторы выражают благодарность компании “Eminence” за предоставление регулятора афукоз EM-N-glycan regulator-2 (Китай), а также лично руководителю российского представительства “Eminence” Шестакову Сергею Анатольевичу и специалисту по развитию бизнеса и маркетингу Беззаботновой Наталии Юрьевне за помощь и содействие в проведении исследования.

Для цитирования: Тимонова С.С., Полупанова А.А., Кирик И.А., Карпунина О.А., Федоров А.А., Зубарева Е.В., Мягкова В.В., Пискунов А.А., Хамитов Р.А. Изменение гликозилирования рекомбинантного иммуноглобулина человека подкласса IgG1 за счет подбора условий культивирования продуцентов и добавок. *Биомедицина*. 2025;21(2):37–48. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-37-48>

Поступила 03.03.2025

Принята после доработки 23.04.2025

Опубликована 10.06.2025

ALTERED GLYCOSYLATION OF SUBCLASS IgG1 RECOMBINANT HUMAN IMMUNOGLOBULIN BY SELECTING CULTURE CONDITIONS FOR PRODUCERS AND ADDITIVES

Sofia S. Timonova^{1,*}, Anna A. Polupanova¹, Inessa A. Kirik¹, Olga A. Karpunina¹,
Alexander A. Fedorov¹, Ekaterina V. Zubareva¹, Vera V. Myagkova²,
Alexander A. Piskunov¹, Ravil A. Khamitov¹

¹ GENERIUM

601125, Russian Federation, Vladimir Region, Petushinsky District, Volginsky Settlement, Vladimirskaia Str., 14

² Eminence Scientific (Suzhou) Co., Ltd.

China, Jiangsu, Suzhou Industrial Park, Sangtian Str., 218, 3F, 24

The possibility to alter the glycosylation profile is an important prerequisite for the development of production technologies of therapeutic recombinant immunoglobulins. Glycans affect various effector functions of the antibody, such as antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cytotoxicity (CDC), and the drug half-life. The possibility to achieve the required glycosylation profile of a therapeutic antibody by optimizing cultivation conditions will facilitate both the creation of more effective drugs and accelerated development of biosimilars. The conducted study found that an increase in the cultivation duration leads to a decrease in the galactose content. The addition of the EM-N-glycan regulator-2 afucose regulator (Eminence, China) led to an increase in the content of afucosylated glycans. The co-expression of the Fut8 enzyme led to an increase in mannose residues. Various approaches to regulation of fucose, mannose, and galactose contents during biosynthesis of IgG1 therapeutic antibody were tested.

Keywords: CHO cell culture, glycosylation profile, recombinant proteins, therapeutic antibodies

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

Funding: the work was funded by GENERIUM.

Acknowledgments: the authors express their gratitude to “Eminence” for providing the afucose regulator EM-N-glycan regulator-2 (China), and also express their personal gratitude to Sergey Anatolievich Shestakov, Head of the Russian representative office of “Eminence”, and Natalia Yurievna Bezzabotnova, Business Development and Marketing Specialist, for their help and assistance in conducting the study.

For citation: Timonova S.S., Polupanova A.A., Kirik I.A., Karpunina O.A., Fedorov A.A., Zubareva E.V., Myagkova V.V., Piskunov A.A., Khamitov R.A. Altered Glycosylation of Subclass IgG1 Recombinant Human Immunoglobulin by Selecting Culture Conditions for Producers and Additives. *Journal Biomed.* 2025;21(2):37–48. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-37-48>

Submitted 03.03.2025

Revised 23.04.2025

Published 10.06.2025

Введение

Среди всех одобренных препаратов на основе рекомбинантных белков более 40% представлены иммуноглобулинами класса G, что подчеркивает важность понимания механизма гликозилирования и изучения способов его контроля и регулирования во время разработки лекарств подобного типа [6].

Гликозилирование представляет собой одну из наиболее распространенных форм пост-трансляционной модификации белка, протекающую в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и аппарате Гольджи клетки, где в результате каскада многоступенчатых реакций с участием различных ферментов происходит образование ковалентной связи между полисахаридной цепью и аминокислотой [17].

Выделяют три основных типа гликозилирования белка, среди которых N-связанное гликозилирование свойственно антителам и способно определять их эффекторную функцию и фармакокинетику [9], а именно ADCC, CDC и время полувыведения препарата [15]. Таким образом, N-гликозилирование терапевтических антител является важным атрибутом качества будущего препарата.

Наличие или отсутствие различных гликоформ определяет функции терапевтического антитела. Так, например, было показано, что снижение уровня фукозилирования IgG усиливает ADCC [12]. С галактозилированными формами обычно связывают наличие у антител способности к стимулированию CDC [5, 21]. Высокоманнозные олигосахариды потенциально могут повлиять на время циркуляции антитела [8]. Так, антитела с высоким уровнем манноз (структуры Man5 и выше) выводятся из кровотока быстрее, чем антитела со зрелыми олигосахаридами сложного типа, что имеет прямое отношение к терапевтической эффективности [11]. Содержание сиалированных гликанов у IgG, получаемых с использованием клеток млекопитающих, в большинстве случаев низкое и имеет низкое влияние на иммуногенность и фармакокинетику [19].

Профиль гликозилирования терапевтических белков и его углеводный состав определяются различными факторами: родительской клеточной линией, условиями культивирования продуцента [16], уровнем экспрессии основных генов ферментов, участвующих в биосинтезе гликанов [2]. Существуют различные подходы для регулирования гликопрофиля IgG:

- **Состав ростовых сред, добавок, регуляторов, ионов металлов**

Состав культуральной среды является одним из критических факторов, который определяет гликопрофиль антитела. В результате экспериментов на примере клеточных линий CHO, экспрессирующих

моноклональные IgG1, было установлено влияние различных добавок на профиль гликозилирования:

- ✓ добавление глюкозамина в ростовую среду приводит к снижению галактозилирования и увеличению относительного содержания фукозилированных гликоформ без концевых остатков галактозы; добавление сульфата меди — к уменьшению количества высокоманнозных гликанов (Man5); добавление уридина приводит к увеличению всех галактозилированных гликоформ и уменьшает количество G0, G0F и Man5; добавление фукозы приводит к уменьшению количества высокоманнозных гликанов и увеличивает G1F [11];

- ✓ добавление галактозы повышает уровень галактозилированных форм [7];

- ✓ добавление сульфата меди приводит к увеличению относительного содержания фукозилированных гликоформ без концевых остатков галактозы [13];

- ✓ добавление ионов цинка — к снижению галактозилирования [22].

- **Условия культивирования: температурный режим, pH, осмоляльность**

Показано, что использование температурного режима со снижением до 33°C в присутствии глюкозамина приводит к изменению гликанового профиля рекомбинантных моноклональных антител [1]; добавление галактозы при определенной осмоляльности и завершении процесса культивирования при жизнеспособности культуры около 50% будет способствовать получению IgG с повышенным содержанием афукозилированных гликанов [14].

- **Нокаут генов ферментов, вовлеченных в биосинтез гликанов**

Гликозилтрансферазы — ферменты, непосредственно участвующие в биосинтезе N-гликанов иммуноглобулинов. Например, альфа-(1,6)-фукозилтрансфераза (alpha(1,6) FT, ген *Fut8*, EC 2.4.1.68) катализирует присоединение фукозы в альфа-1-6 связи к первому остатку GlcNAc, следующему

за пептидными цепями в N-гликанах, и тем самым отвечает за фукозилирование остова N-гликанов иммуноглобулина в клетках млекопитающих. Так, в работах исследователей разных групп показано, что клетки линии CHO, нокаутированные по *Fut8*, могут быть использованы для получения афукозилированных антител [20], которые обладают высокой активностью ADCC и эффективностью [4].

• **Снижение активности ферментов, участвующих в биосинтезе отдельных гликанов**

Изменение количества отдельных гликанов можно контролировать с помощью компонентов, подавляющих активность фермента, вовлеченного в биосинтез конкретного гликана. Так, например, было показано, что фукозилирование антитела IgG1 можно снизить с помощью добавления дезоксиманноджиримицина (DMJ), ингибитора лизосомальной α -маннозидазы (ЕС 3.2.1.24), при одновременном повышении уровня манноз [18].

Гликоинженерия и исследование влияния отдельных гликанов на функциональность антитела широко изучаются для улучшения качества биотерапевтических препаратов на основе рекомбинантных белков.

Цель работы — проведение ряда экспериментов по культивированию продуцентов IgG1 для изучения факторов, влияющих на регулирование гликанов: использование разных клеточных линий, коэкспрессии фермента *Fut8*, добавления коммерческого регулятора, а также длительности культивирования продуцента иммуноглобулина IgG1.

Материалы и методы

Плазмиды, кодирующие IgG1

Синтетические кодон-оптимизированные для экспрессии в клетках CHO гены *IgG1* (кодирующая нуклеотидная последовательность с фланкирующими сайтами рестрик-

ции) были клонированы в экспрессионные векторы с разными селективными маркерами. Экспрессия генов легкой и тяжелой цепей находилась под контролем промотора цитомегаловируса человека (CMV). Пример экспрессионных векторов представлен в статье, опубликованной авторами ранее [3]. В данной работе использовали аналогичные экспрессионные конструкции с генами *IgG1* легкой и тяжелой цепей антитела человека.

Суспензионное культивирование клеток CHO

Клетки CHO-K1, CHO-S, CHO-GS (ауксотрофы по глутамину) адаптировали к росту в бессывороточной среде BalanCD Growh A (“FUJIFILM Irvine Scientific”, США) и культивировали при условиях: 37°C, 5% CO₂, влажность более 70% в шейкер-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (“Kuhner”, Швейцария).

Расчет ростовых характеристик клеточных культур

Концентрацию жизнеспособных клеток и жизнеспособность культуры определяли с помощью автоматического счетчика клеток Countess II FL Automated Cell Counter (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Трансфекция клеток CHO методом электропорации

Клетки CHO трансфицировали плазмидами, несущими гены *IgG1* легкой и тяжелой цепей антитела, на системе MaxCyte STX (“MaxCyte”, США) согласно инструкции прибора.

Получение продуцентов, экспрессирующих IgG1

Трансфицированные клетки высевали в плоскостонные 96-луночные планшеты в селективную среду. Затем проводили скрининг культуральной жидкости (КЖ) по продуктивности из 96-луночных планшетов, после чего продуценты с высоким титром переводили в 6-луночные планшеты. Далее проводили скрининг 6-луночных планшетов и переводили продуценты

с максимальной продуктивностью в мини-биореакторы.

Иммуноферментный анализ

Для определения концентрации IgG1 проводили ИФА в 96-луночных планшетах MaxiSorp (“Thermo Scientific Nunc”, Дания). Использовали сорбирующие антитела I1886 (“Sigma”, США). В качестве детектирующих антител использовали ab8667 (HRP, “Sigma”, США). В качестве стандарта применяли рекомбинантный человеческий IgG1 (“Abcam”, США, ab155632). Измерения проводили на спектрофотометре Synergy LX при 450 нм (“BioTek Instruments Inc.”, США).

Культивирование продуцентов с подпиткой проводили в мини-биореакторах (“Techno Plastic Products AG”, Швейцария) в 20 мл питательной среды BCD, 5% CO₂, 37°C. Для культивирования продуцентов использовали шейкер-инкубатор Climo-Shaker ISF1-XC (“Kuhner”, Швейцария), 200 об/мин. В качестве регулятора афукоз добавляли EM-N-glycan regulator-2 (“Eminence”, Китай, cat: 240304.0010) 1-3% от объема культивирования, однократно в первые сутки.

Хроматографическая очистка IgG1

Для очистки IgG1 использовали сорбент MabSelect SuRe (“Cytiva”, Швеция). КЖ с целевым белком наносили на колонку, предварительно уравновешенную стартовым буфером (20 mM ацетата натрия, 150 mM натрия хлорида, pH=5,3). По окончании нанесения сорбент промывали 3 CV стартового буфера и 5 CV щелочного буфера, содержащего 1 M натрия хлорид. Элюировали целевой белок с сорбента буфером с ацетатом натрия (pH=3,7). Сбор фракции начинали при OD=200 mAU (λ=280 нм) и заканчивали при снижении до 200 mAU. Финальную очистку проводили последовательной фильтрацией через сорбенты Eshmuno CPX (“MERCK”) и Capto Adhere (“Cytiva”, Швеция), уравновешенные 3 CV стартового буфера. По окончании

нанесения образца хроматографию продолжали, промывая колонку р-ром стартового буфера. Сбор фракции фильтрата начинали при достижении OD=200 mAU (при λ=280 нм) и заканчивали при снижении до 300 mAU.

Измерение профиля гликозилирования IgG1

Для отщепления гликанов от IgG1 использовали фермент PNGase F (производства АО «Генериум»). Образцы дериватизировали р-ром, содержащим флуорофор 2-аминобензойную кислоту (2AA). Меченые 2AA-гликаны были проанализированы с использованием хроматографической системы Waters Alliance с флуориметрическим детектором 2475 при длинах волн возбуждения 260 нм и эмиссии 425 нм на колонке AdvanceBio Glycan Map (2,1×150 мм, Agilent) в градиенте подвижных фаз ацетонитрила и 100 mM формиата аммония, pH=4,5. Содержание каждого гликана рассчитывали методом нормализации площадей и выражали в процентах. Общий процент содержания гликановых групп рассчитывали следующим образом:

$$\text{Галактозилированные, \%} = \frac{(G1+G1F+G1FB+G2+G2F)}{(\sum S)} \times 100;$$

$$\text{Афукозилированные, \%} = \frac{(G0+G0N+G1+G2)}{(\sum S)} \times 100;$$

$$\text{Высокоманозные, \%} = \frac{(\text{Man3}+\text{Man5}+\text{Man6}+\text{Man7}+\text{Man8})}{(\sum S)} \times 100;$$

$$\text{Сиалированные, \%} = \frac{(G1FS1+A1+A1F+A2+A2F)}{(\sum S)} \times 100;$$

где $\sum S$ — сумма площадей всех пиков гликанов.

Статистический обсчет результатов был выполнен в программе Graph Pad Prism 6. Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA test) или t-критерий Стьюдента (unpaired t-test). Если $p_{\text{value}} < 0,0001 = ****$; $p_{\text{value}} < 0,001 = ***$; если $p_{\text{value}} < 0,01 = **$; $p_{\text{value}} < 0,05 = *$; ns — нет

статистической разницы; данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (SD).

Результаты и их обсуждение

Провели ряд экспериментов для изучения и регулирования профиля гликозилирования рекомбинантного человеческого IgG1:

1) Влияние длительности культивирования на гликопрофиль IgG1

Продуценты IgG1 получены на основе суспензионной линии CHO-S, культивировали в течение 11, 12, 13 и 14 сут (рис. 1). Жизнеспособность продуцентов во всех

группах оставалась высокой и не снижалась менее 80% (рис. 1E). Плотность жизнеспособных клеток для всех групп не различалась (рис. 1F). Продуктивность белка после очистки представлена на рис. 1G. Наблюдали статистически подтвержденное снижение содержания галактоз (рис. 1A) и силовых кислот (рис. 1D) с увеличением продолжительности культивирования продуцентов.

2) Влияние коммерческого регулятора на содержание афукозилированных гликанов

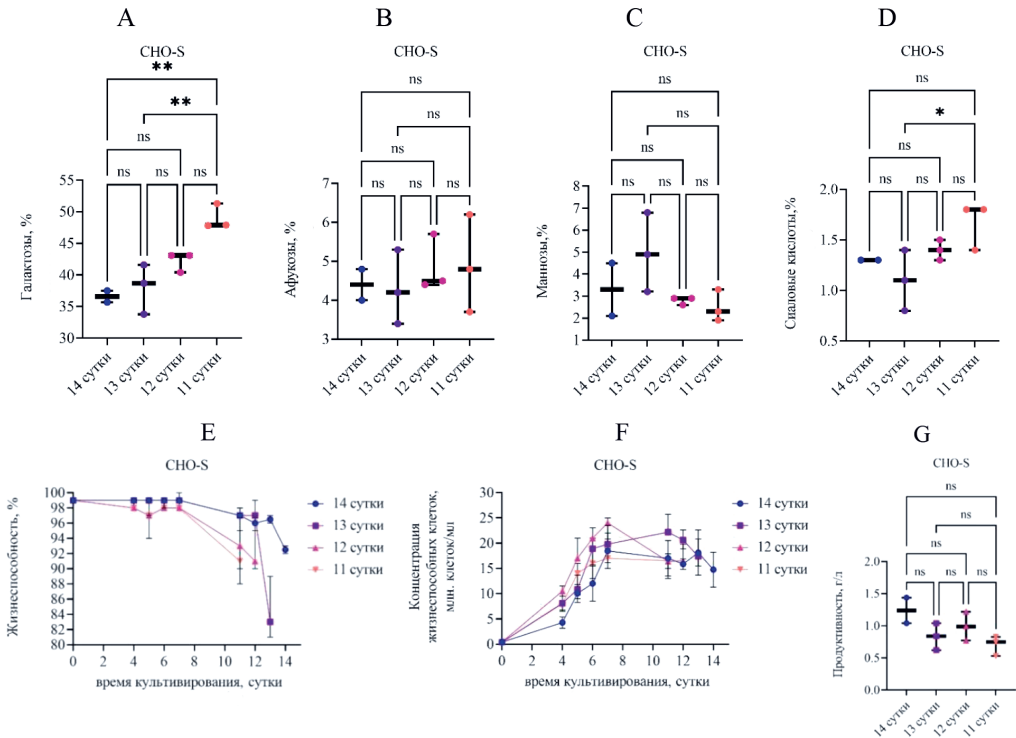


Рис. 1. Культивирование продуцентов IgG1 на основе клеток линии CHO-S в течение 11, 12, 13 и 14 сут.

Примечание: ростовая среда BalanCD, подкормка BalanCD Feed 4 с 3-х сут до конца процесса культивирования. Концентрация жизнеспособных клеток во время посева 0,4 млн клеток/мл. Объем культивирования 20 мл. Снижение температуры на 6 сут до 32°C.

Fig. 1. Cultivation of IgG1 producers based on CHO-S cell line cells during 11, 12, 13, and 14 days.

Note: BalanCD growth medium, BalanCD Feed 4 from day 3 to the end of the culturing process. Concentration of viable cells at the time of seeding – 0.4 million cells/ml. Culturing volume – 20 ml. Decrease in temperature to 32°C on day 6.

Продуценты IgG1 получены на основе суспензионной линии CHO-GS, культивирование проводили при 37°C. При равных ростовых и продукционных показателях (рис. 2Е, -F, -G) наблюдали статистически значимое снижение афукозилированных гликанов (рис. 2В) при добавлении регулятора EM-N-glycan regulator-2. Также наблюдали снижение содержания маннозных остатков, однако статистически это не было подтверждено (рис. 2С).

3) Влияние клеточной линии на глико-профиль IgG1

Продуценты IgG1 на основе двух клеточных линий CHO-S и CHO-K1 культивировали в одинаковых условиях в течение 14 сут с температурным шифтом до 32°C на 6 сут процесса. Можно наблюдать, что жизнеспособность продуцента IgG1 на основе клеток линии CHO-S оставалась выше на всем протяжении процесса (рис. 3А). Плотность жизнеспособных

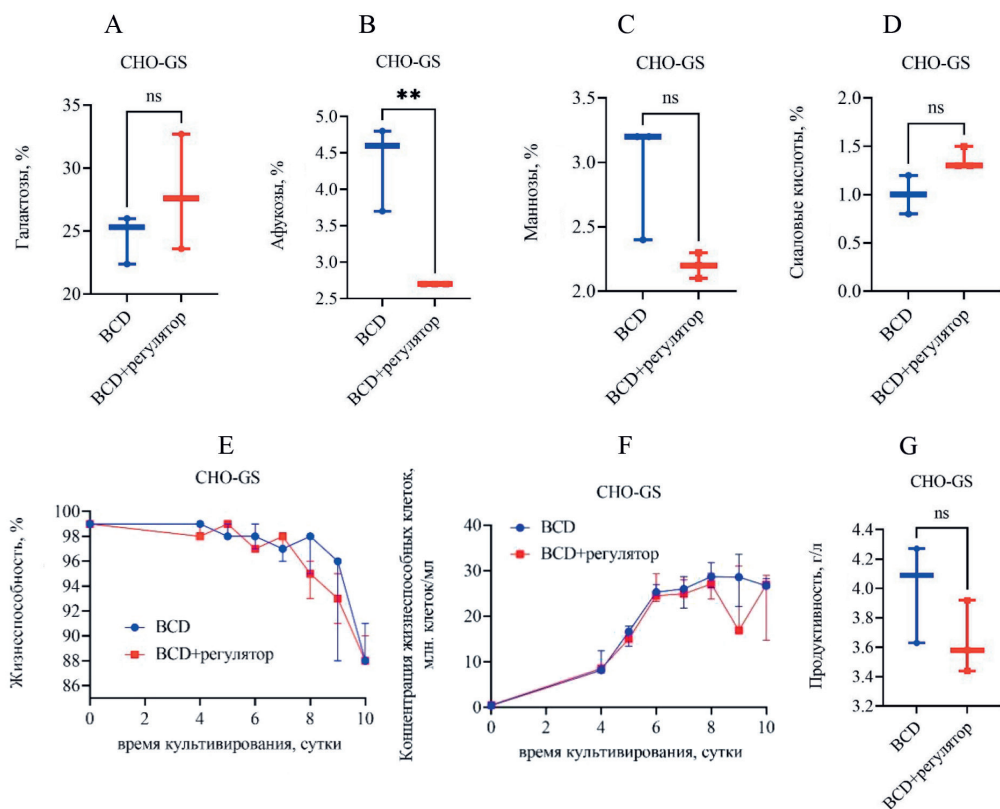


Рис. 2. Культивирование продуцентов IgG1 на основе клеток линии CHO-GS в течение 10 сут с добавлением регулятора афукоз.

Примечание: ростовая среда BalanCD, подкормка BalanCD Feed 4 с 3-х сут до конца процесса культивирования. Концентрация жизнеспособных клеток во время посева 0,4 млн клеток/мл. Объем культивирования 20 мл. Добавка регулятора афукоз EM-N-glycan regulator-2, 1-3% от объема культивирования, однократно в первые сутки. Температурный режим — 37°C.

Fig. 2. Cultivation of IgG1 producers on the basis of CHO-GS cells during 10 days with the addition of an afucose regulator.

Note: BalanCD growth medium, BalanCD Feed 4 from day 3 to the end of the culturing process. Concentration of viable cells at the time of seeding – 0.4 million cells/ml. Culturing volume – 25 ml. Addition of EM-N-glycan regulator-2 afucose regulator – 1–3% of the cultivation volume, once on day 1. Temperature regime — 37°C.

клеток на протяжении всего процесса культивирования наблюдали выше у продуцента IgG1 на основе клеток линии CHO-K1 (рис. 3F). Продуктивность продуцентов IgG1 на основе клеток линии CHO-K1 значительно отличалась от продуктивности продуцентов IgG1 на основе клеток линии CHO-S и составляла 3,7 г/л против 1,0 г/л. Наблюдали следующие различия в гликопрофиле: снижение галактоз у продуцентов на основе CHO-K1 (рис. 3A), значительное отличие в количестве афукозилированных гликанов продуцентов двух групп (рис. 3B).

4) Влияние коэкспрессии фермента Fut8 на гликопрофиль IgG1

Коэкспрессия ферментов, отвечающих за биосинтез определенных гликанов, может повлечь за собой изменение различных гликоформ. Проводили эксперимент с получением продуцентов, коэкспрессирующих IgG1 и внутриклеточный Fut8. У продуцентов, коэкспрессирующих Fut8, наблюдали снижение галактоз (рис. 4A), афукоз (рис. 4B) и сиаловых кислот (рис. 4D), вместе с тем наблюдали значительное повышение маннозных остатков (рис. 4C).

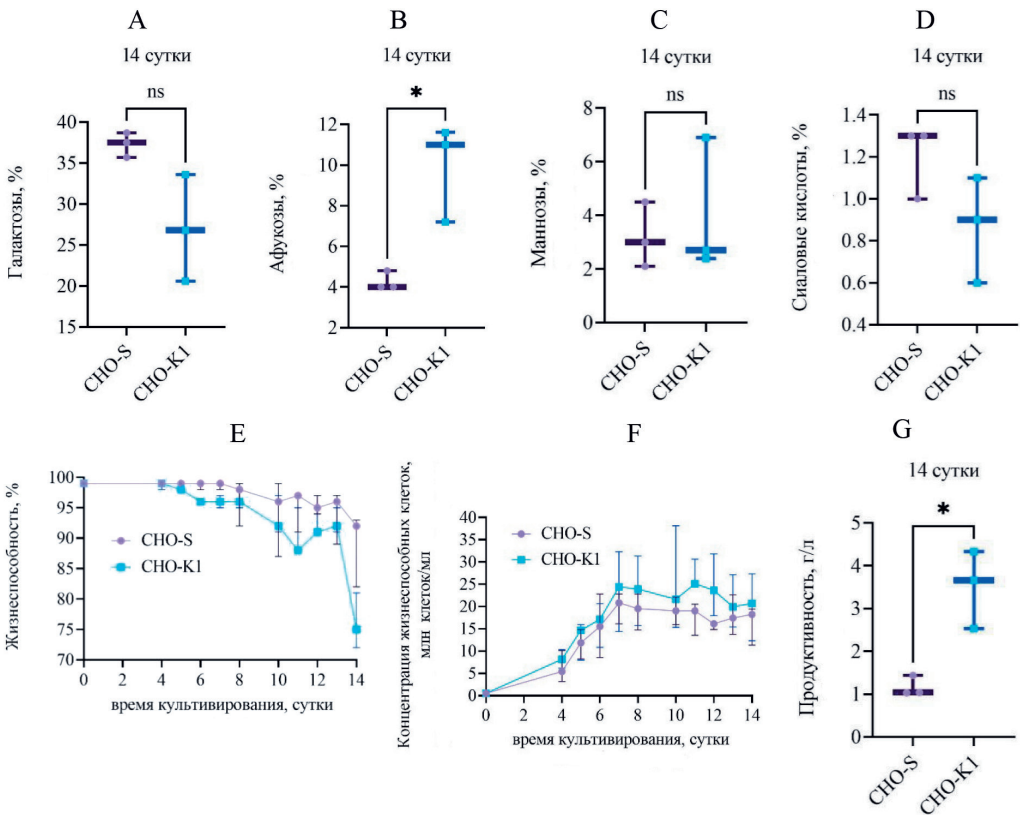


Рис. 3. Культивирование продуцентов IgG1 на основе клеток линии CHO-S и CHO-K1 в течение 14 сут.

Примечание: ростовая среда BalanCD, подкормка BalanCD Feed 4 с 3-х сут до конца процесса культивирования. Концентрация жизнеспособных клеток во время посева 0,4 млн клеток/мл. Объем культивирования 20 мл.

Fig. 3. Cultivation of IgG1 producers on the basis of CHO-S and CHO-K1 cells during 14 days.

Note: BalanCD growth medium, BalanCD Feed 4 from day 3 to the end of the culturing process. Concentration of viable cells at the time of seeding – 0.4 million cells/ml. Culturing volume – 20 ml.

Ростовые (данные не приведены) и продукционные характеристики при этом не отличались (рис. 4Е).

В биотехнологической промышленности используют клетки млекопитающих при производстве терапевтических белков для получения гликозилирования, подобного белкам человека [10], но сложности управления структурами гликанов по-

прежнему представляют существенную проблему.

Гликозилирование белков может влиять на время полувыведения, эффекторную функцию и иммуногенность, что напрямую влияет на эффективность и безопасность препарата [11]. Поэтому регуляция гликозилирования терапевтического белка занимает важное место при разработке

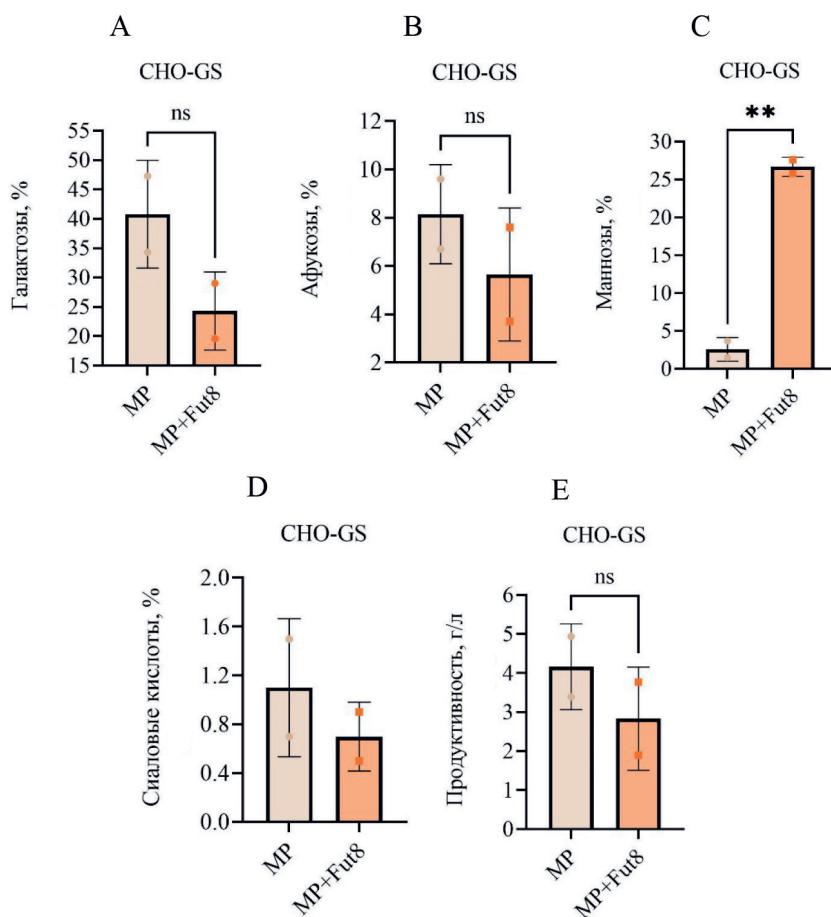


Рис. 4. Культивирование продуцентов IgG1 с котрансфекцией ферментом Fut8 на основе клеток линии CHO-GS в течение 10 сут при температуре 37°C.

Примечание: ростовая среда BalanCD, подкормка BalanCD Feed 4 с 3-х сут до конца процесса культивирования. Концентрация жизнеспособных клеток во время посева 0,4 млн клеток/мл. Объем культивирования 20 мл.
Fig. 4. Cultivation of IgG1 producers with cotransfection with Fut8 enzyme on the basis of CHO-GS cells during 10 days at 37°C.

Note: BalanCD growth medium, BalanCD Feed 4 from day 3 to the end of the culturing process. Concentration of viable cells at the time of seeding – 0.4 million cells/ml. Culturing volume – 20 ml.

лекарственных средств. Понимание того, в каком направлении и в какой степени можно регулировать гликозилирование IgG, является важной задачей для получения эффективных терапевтических препаратов на основе рекомбинантных IgG.

Способность контролировать гликозилирование необходима для воспроизводимости желаемых свойств терапевтических белков. Во время разработки лекарственного препарата необходимо стремиться достичь оптимального и постоянного гликопрофиля продукта, который должен быть определен в самом начале его разработки и поддерживаться постоянным на протяжении всех стадий производства, тем самым обеспечивая его терапевтическую эффективность и безопасность.

Выводы

В результате экспериментов было показано, каким способом можно влиять на гликопрофиль рекомбинантного человеческого IgG1:

1) снижение галактоз можно осуществить с помощью длительности культивирования;

2) снижения афукозилированных гликанов можно добиться за счет добавления регулятора афукоз EM-N-glycan regulator-2;

3) коэкспрессия фермента Fut8 приводит к увеличению маннозных остатков.

Данные подходы для регулирования гликанов можно применять во время разработки биофармацевтических препаратов на основе человеческих IgG1, полученных с использованием клеточных линий CHO.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Гузов Е.А., Цирулева М.А., Исеркапов А.В., Тюкова А.П., Казин В.Н., Колышкин В.М., Игнат'ев В.Г. Влияние глюкозамина и ионов меди на формирование профиля гликозилирования моноклональных антител в клетках CHO. *Биотехнология*. 2023;39(2):3–9. [Guzov E.A., Ciruleva M.A., Iserkapov A.V., Tyukova A.P., Kazin V.N., Kolyshkin V.M., Ignat'ev V.G. Vliyaniye glyukozamina i ionov medi na formirovaniye profilya glykozilirovaniya monoklona'lynykh antitel v kletkakh CHO [The effect of glucosamine and copper ions on the formation of the glycosylation profile of monoclonal antibodies in CHO cells]. *Biotechnology*. 2023;39(2):3–9. (In Russian)]. DOI: 10.56304/S0234275823020035.
2. Дорохов Ю.Л., Шешукова Е.В., Кособокова Е.Н., Шиндяпина А.В., Косоруков В.С., Комарова Т.В. Роль углеводных остатков в функционировании иммуноглобулина G человека и терапевтических моноклональных антител. *Биохимия*. 2016;81(8):1069–1090. [Dorohov Yu.L., Sheshukova E.V., Kosobokova E.N., Shindyapina A.V., Kosorukov V.S., Komarova T.V. Rol' uglevodnykh ostatkov v funkcionirovaniy immunoglobulina G cheloveka i terapevticheskikh monoklona'lynykh antitel [Role of carbohydrate residues in the function of human immunoglobulin G and therapeutic monoclonal antibodies]. *Biochemy*. 2016;81(8):1069–1090. (In Russian)].
3. Тимонова С.С., Смолова К.А., Зарипова Д.Т., Пантюшенко М.С., Королева М.А., Анисимов Р.Л., Хамитов Р.А., Пискунов А.А., Бадэ В.Н. Увеличение продуктивности клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилин генирирующего фермента. *БИОпрепараты*. Профилактика, диагностика, лечение. 2022;22(1):80–93. [Timonova S.S., Smolova K.A., Zaripova D.T., Pantyushenko M.S., Koroleva M.A., Anisimov R.L., Hamitov R.A., Piskunov A.A., Bade V.N. Uvelicheniye produktivnosti kletочноy linii-producenta arilsul'fatazy B za schet koekspressii formilglycin generiruyushchego fermenta] [Increased productivity of the aryl sulfatase B producing cell line due to co-expression of the formylglycine-generating enzyme]. *Biological products. Prevention, diagnosis, treatment*. 2022;22(1):80–93. (In Russian)]. DOI: 10.56304/S0234275824010113.
4. Abès R., Teillaud J.L. Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010;3(1):146–157.
5. Aoyama M., Hashii N., Tsukimura W., Osumi K., Harazono A., Tada M., Kiyoshi M., Matsuda A., Ishii-Watabe A. Effects of terminal galactose residues in mannose α 1–6 arm of Fc-glycan on the effector functions of therapeutic monoclonal antibodies. *MAbs*. 2019;11(5):826–836.
6. Barolo L., Abbriano R.M., Commault A.S., George J., Kahlke T., Fabris M., Padula M.P., Lopez A., Ralph P.J., Pernice M. Perspectives for Glyco-Engineering of Recombinant Biopharmaceuticals from Microalgae. *Cells*. 2020;9(3):633.
7. Ehret J., Zimmermann M., Eichhorn T., Zimmer A. Impact of cell culture media additives on IgG glycosylation produced in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*. 2019;116(4):816–830.
8. Goetze A.M., Liu Y.D., Zhang Z., Shah B., Lee E., Bondarenko P.V., Flynn G.C. High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies

- increase serum clearance in humans. *Glycobiology*. 2011;21(7):949–959.
9. Higel F., Seidl A., Sörgel F., Friess W. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2016;100:94–100.
10. Hossler P., Khattak S.F., Li Z.J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*. 2009;19(9):936–949.
11. Loebrich S., Clark E., Ladd K., Takahashi S., Brousseau A., Kitchener S., Herbst R., Ryll T. Comprehensive manipulation of glycosylation profiles across development scales. *MAbs*. 2019;11(2):335–349.
12. Peipp M., Lammerts van Bueren J.J., Schneider-Merck T., Bleeker P.W., Dechant M., Beyer T., Repp R., van Berkel P.H., Vink T., van de Winkel J.G., Parren P.W., Valerius T. Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood*. 2008;112(6):2390–2399.
13. *Process for manipulating the level of glycan content of a glycoprotein*. Leiske D.R., Trentalange M.T. Patent US 10,167,492 B2, 01.01.2019. Application No.: 15/529,950 from 01.12.2015.
14. *Process of obtaining glycoprotein composition with increased afucosylation content*. Makapati S., Nikam V.S., Subrahmanyam S. Patent WO 2013/114165 A1, 08.08.2013. International Application No.: PCT/IB2012/057091 from 08.12.2012.
15. Reusch D., Tejada M.L. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology*. 2015;25(12):1325–1334.
16. Ryman J.T., Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 2017;6(9):576–588.
17. Schjoldager K.T., Narimatsu Y., Joshi H.J., Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(12):729–749.
18. Shalel L.S., Aharonovitz O., Maor-Shoshani A., Abraham G., Kenett D., Aloni Y. An efficient method to control high mannose and core fucose levels in glycosylated antibody production using deoxymannojirimycin. *Journal of Biotechnology*. 2018;276-277:54–62.
19. Vlasak J., Ionescu R. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2008;9(6):468–481.
20. Yang G., Wang Q., Chen L., Betenbaugh M.J., Zhang H. Glycoproteomic Characterization of FUT8 Knock-Out CHO Cells Reveals Roles of FUT8 in the Glycosylation. *Frontiers in Chemistry*. 2021;9:755238.
21. Zhang L., Luo S., Zhang B. Glycan analysis of therapeutic glycoproteins. *MAbs*. 2016;8(2):205–215.
22. *Zinc supplementation for decreasing galactosylation of recombinant glycoproteins*. Gadgil M.C., Prabhu A.J., Gadre, R.V. Patent WO 2019/077628 A1, 25.04.2019. International Application No.: PCT/IN2018/050665 from 16.10.2028.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тимонова Софья Сергеевна*, к.б.н., АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: Timonova@generium.ru

Sofia S. Timonova*, Cand. Sci. (Biol.), GENERIUM;
e-mail: Timonova@generium.ru

Полупанова Анна Алексеевна, АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: Aapolupanova@generium.ru

Anna A. Polupanova, GENERIUM;
e-mail: Aapolupanova@generium.ru

Кирик Инесса Анатольевна, к.б.н., АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: Kirik@generium.ru

Inessa A. Kirik, Cand. Sci. (Biol.), GENERIUM;
e-mail: Kirik@generium.ru

Карпунина Ольга Александровна, АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: karpunina.olga@generium.ru

Olga A. Karpunina, GENERIUM;
e-mail: karpunina.olga@generium.ru

Федоров Александр Андреевич, АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: sashaf19956@gmail.com

Alexander A. Fedorov, GENERIUM;
e-mail: sashaf19956@gmail.com

Зубарева Екатерина Валерьевна, АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: zubareva@generium.ru

Ekaterina V. Zubareva, GENERIUM;
e-mail: zubareva@generium.ru

Мягкова Вера Витальевна, к.б.н., Eminence Scientific (Suzhou) Co., Ltd.;
e-mail: Vera.Myagkova@eminencebio.com

Vera V. Myagkova, Cand. Sci. (Biol.), Eminence Scientific (Suzhou) Co., Ltd.;
e-mail: Vera.Myagkova@eminencebio.com

Пискунов Александр Александрович, к.б.н., АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: a.piskunov@pharmasyntez.com

Alexander A. Piskunov, Cand. Sci. (Biol.), GENERIUM;
e-mail: a.piskunov@pharmasyntez.com

Хамитов Равиль Авгатович, д.м.н., АО «ГЕНЕРИУМ»;
e-mail: Khamitov@generium.ru

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), GENERIUM;
e-mail: Khamitov@generium.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

АНКСИОЛИТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДА GHK-GP И ЕГО СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ В ТЕСТЕ ПРИПОДНЯТОГО КРЕСТООБРАЗНОГО ЛАБИРИНТА

М.Е. Алферова^{1*}, И.И. Бобынцев¹, А.О. Ворвуть¹, А.Н. Тенькова¹,
Л.А. Андреева², Н.Ф. Мясоедов²

¹ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России
305041, Российская Федерация, Курск, ул. Карла Маркса, 3

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
123182, Российская Федерация, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

В настоящее время регуляторные пептиды представляют большой интерес для исследования с целью разработки на их основе новых лекарственных препаратов. Одним из перспективных для изучения является пептид Gly-His-Lys (GHK). Однако его высокая подверженность действию протеаз требует разработки различных методов его защиты. Одним из таковых является присоединение Pro-Gly-Pro (PGP), а также различных пролинсодержащих аминокислотных последовательностей к С-концу GHK. Биологические эффекты новых образованных олигопептидов могут существенно отличаться от биологических эффектов GHK. Целью исследования стало изучение анксиолитических эффектов пептида GHK-GP (Gly-His-Lys-Gly-Pro) и его структурных аналогов в тесте приподнятого крестообразного лабиринта. Эксперименты выполнены на 200 крысах-самцах Wistar. В работе были использованы пептиды: GHK, PGP, GHK-PGP, GHK-GP, GHK-P (Gly-His-Lys-Pro), GHK-VEP (Gly-His-Lys-Val-Glu-Pro). Пептиды вводили внутривентрально в дозах 0,5, 5,0 и 50,0 мкг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора. Анксиолитическую активность в ненаказуемых условиях оценивали с использованием приподнятого крестообразного лабиринта. В результате исследования установлено, что пептид GHK обладал анксиолитической активностью во всех исследуемых дозах. У пептида PGP и GHK-PGP анксиолитического действия в рамках данного эксперимента не установлено. Таким образом, можно предположить, что пептид PGP полностью нивелирует анксиолитический эффект GHK. Также анксиолитический эффект полностью отсутствовал у пептидов GHK-P и GHK-VEP, что говорит о блокировании анксиолитического эффекта GHK за счет присоединения к его С-концу пролина и аминокислотной последовательности Val-Glu-Pro. Пептид GHK-GP, наоборот, обладал весьма выраженной анксиолитической активностью в дозах 0,5 и 5,0 мкг/кг, что может говорить о потенцировании анксиолитического эффекта GHK за счет присоединения к нему дипептида Gly-Pro, а также о непосредственном анксиолитическом действии самого пептида Gly-Pro посредством его прямого либо опосредованного нейротропного действия.

Ключевые слова: регуляторные пептиды, Gly-His-Lys, глипролины, анксиолитический эффект, приподнятый крестообразный лабиринт

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Алферова М.Е., Бобынцев И.И., Ворвуть А.О., Тенькова А.Н., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Анксиолитические эффекты пептида GHK-GP и его структурных аналогов в тесте приподнятого крестообразного лабиринта. *Биомедицина*. 2025;21(2):49–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-49-57>

Поступила 24.01.2025

Принята после доработки 10.04.2025

Опубликована 10.06.2025

ANXIOLYTIC EFFECTS OF GHK-GP PEPTIDE AND ITS STRUCTURAL ANALOGUES IN ELEVATED PLUS MAZE TEST

Marina E. Alferova^{1,*}, Igor I. Bobyntsev¹, Anton O. Vorvul¹, Anna N. Tenkova¹,
Lyudmila A. Andreeva², Nikolay F. Myasoedov²

¹ Kursk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
305041, Russian Federation, Kursk, Karla Marksa Str., 3

² National Research Centre "Kurchatov Institute"
123182, Russian Federation, Moscow, Academician Kurchatov Square, 1

Regulatory peptides are currently attracting research interest due to their potential application in the creation of new drugs. Among them, Gly-His-Lys (GHK) peptide seems to be promising. However, its high susceptibility to proteases requires the development of various methods for its protection, such as the addition of Pro-Gly-Pro (PGP), as well as various proline-containing amino acid sequences, to the C-terminus of GHK. The biological effects of the newly formed oligopeptides can differ significantly from those of GHK. In this work, we investigate the anxiolytic effects of the GHK-GP (Gly-His-Lys-Gly-Pro) peptide and its structural analogs in an elevated plus maze test. The experiments involved 200 male Wistar rats and the following peptides: GHK, PGP, GHK-PGP, GHK-GP, GHK-P (Gly-His-Lys-Pro), and GHK-VEP (Gly-His-Lys-Val-Glu-Pro). The peptides were administered intraperitoneally at doses of 0.5, 5.0, and 50.0 µg/kg. Animals in the control group were administered equivalent volumes of saline. Anxiolytic activity under non-punishable conditions was assessed using an elevated plus maze. GHK peptide was revealed to exhibit anxiolytic activity at all the doses studied. PGP and GHK-PGP peptides did not exhibit anxiolytic action in this experiment. Thus, it can be assumed that PGP peptide completely neutralizes the anxiolytic effect of GHK. In addition, the anxiolytic effect was completely absent in the GHK-P and GHK-VEP peptides, which also indicates the blocking of the anxiolytic effect of GHK due to the attachment of proline and the amino acid sequence Val-Glu-Pro to its C-terminus. The GHK-GP peptide, conversely, showed a pronounced anxiolytic activity at doses of 0.5 and 5.0 µg/kg, which may indicate the potentiation of the anxiolytic effect of GHK due to the attachment of the Gly-Pro dipeptide, as well as the direct anxiolytic effect of the Gly-Pro peptide per se through its direct or indirect neurotropic action.

Keywords: regulatory peptides, Gly-His-Lys, glyprolines, anxiolytic effect, elevated plus maze

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

For citation: Alferova M.E., Bobyntsev I.I., Vorvul A.O., Tenkova A.N., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. Anxiolytic Effects of GHK-GP Peptide and its Structural Analogues in Elevated Plus Maze Test. *Journal Biomed.* 2025;21(2):49–57. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-49-57>

Submitted 24.01.2025

Revised 10.04.2025

Published 10.06.2025

Введение

Регуляторные олигопептиды в настоящее время являются перспективными субстанциями для последующей разработки и производства лекарственных препаратов [7], обладая широким спектром биологических эффектов, в т. ч. способностью проникать через гематоэнцефалический

барьер и оказывать действие на структуры центральной нервной системы [6]. К их числу относится пептид GHK, который входит в аминокислотную последовательность коллагена первого типа, высвобождается при повреждении тканей, обладает сродством к меди и оказывает стимулирующее действие на синтез коллагена,

гликозамингликанов, протеогликана декорина, оказывает модулирующее влияние на активность металлопротеиназ и антипротеиназ, играет существенную роль в поддержании баланса между протеолизом и накоплением белков и способствует ускорению заживления ран [8, 10]. Также экспериментально было установлено, что пептид GHK, а также пептиды, содержащие данную аминокислотную последовательность, стимулируют восстановление и иннервацию в поврежденных тканях за счет стимуляции нейротрофических факторов [9].

В предыдущих исследованиях нами был установлен анксиолитический эффект GHK [2], а также его влияние на болевую чувствительность [1]. В данном случае с целью повышения устойчивости пептида к деградирующему действию протеаз была использована защита его молекулы с использованием D-аланина, которая подтвердила свою эффективность и при исследовании процессов регенерации на модели кожной раны [4]. При этом при создании фармакологических препаратов на основе коротких регуляторных пептидов (семакс, селанк) в качестве защиты молекулы от действия протеаз использованы пролинсодержащие аминокислотные последовательности, которые, в свою очередь, обладают целым рядом биологических эффектов [5]. Поэтому перспективным представляется изучение различных модификаций GHK с помощью глипролинов.

Цель работы — изучение анксиолитических эффектов пептида GHK-GP и его структурных аналогов в тесте приподнятого крестообразного лабиринта.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 200 крысах-самцах Wistar массой 170–190 г, полученных из SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН, прошедших карантинный контроль вивария Курского

государственного медицинского университета. Животные содержались в клетках по 10 особей в стандартных условиях вивария и получали стандартный гранулированный корм и воду в свободном доступе при 12-часовом световом режиме (12 часов — свет, 12 часов — темнота) и контролируемой температуре ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Исследования проводили в промежуток времени с 9 до 15 ч. С целью предотвращения стрессорной реакции на взятие в руки экспериментатора животных ежедневно подвергали процедуре хэндлинга.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры проводили в соответствии с Директивой ЕС о защите животных, используемых в научных целях, — EU Directive 2010/63/EU, принятой 22 сентября 2010 г., соответствовали принципам Базельской декларации. Эксперименты проводились под контролем Этического комитета ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России.

В работе были использованы пептиды, синтезированные в лаборатории молекулярной фармакологии пептидов НИЦ «Курчатовский институт»: GHK, PGP, GHK-PGP, GHK-GP, GHK-P, GHK-VER.

Пептиды растворяли в физ. р-ре и вводили внутривентально за 15 мин до начала эксперимента в дозах 0,5, 5,0 и 50,0 мкг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физ. р-ра из расчета 1 мл/кг массы тела. Были сформированы две контрольные группы: в серии опытов с GHK, PGP, GHK-PGP и в опытах с GHK-GP, GHK-P и GHK-VER.

Анксиолитическую активность в ненаказуемых условиях оценивали с использованием приподнятого крестообразного лабиринта (“Panlab Harvard Apparatus”, Испания) [3]. Лабиринт состоит из центральной площадки и крестообразно расхо-

дящихся от нее под прямым углом четырех «рукавов», два противоположных открыты (без стенок), а два других — закрыты (имеют стенки), приподнят над уровнем пола на высоту 1 м. Освещенность во время эксперимента составляла 300 люкс для открытых рукавов, 45 люкс для закрытых рукавов и 240 люкс для центральной площадки. Животное предварительно находилось 2 мин в темной камере, затем его пересаживали в лабиринт на центральную площадку головой к открытому «рукаву». В течение 5 мин с помощью системы видео-трекинга SMART Video Tracking System (“PanLab Harvard Apparatus”, Испания) регистрировали следующие показатели поведения животных: число заходов в открытые и закрытые «рукава», время пребывания в открытых, закрытых «рукавах», а также на центральной площадке, число свешиваний с открытых «рукавов», пройденная дистанция в открытых «рукавах», в закрытых «рукавах», а также на центральной площадке лабиринта.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA 10 (“Statsoft”, США). Характер распределения признаков в статистической выборке определяли с помощью критерия Шапиро — Уилка. С учетом непараметрического характера распределения признаков значимость полученных результатов оценивали с применением непараметрического однофакторного дисперсионного анализа с помощью критериев Краскела — Уоллиса и Манна — Уитни. Полученные результаты представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3. Результаты считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что после введения пептида GHK в дозе 0,5 мкг/кг массы тела общее время в закрытых «рукавах» лабиринта было существенно (в 1,6 раза) меньше, чем

в контрольной группе ($p=0,022$), а среднее число свешиваний с открытых участков лабиринта превышало их число в контрольной группе более чем в два раза ($p=0,047$) (табл. 1). Среднее время в открытых «рукавах» существенно превышало аналогичный показатель в контрольной группе, однако данные различия были статистически не значимыми ($p=0,068$). Увеличение пройденной дистанции в открытых «рукавах» у животных, получивших пептид GHK в дозе 0,5 мкг/кг, также не было статистически значимым ($p=0,068$). У животных, получавших пептид GHK в дозе 50 мкг/кг, отмечалось значимое увеличение дистанции ($p=0,038$) и общего времени нахождения в открытых «рукавах» лабиринта ($p=0,038$) по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы. Данные результаты свидетельствуют о наличии анксиолитического эффекта пептида GHK в дозах 0,5 и 50,0 мкг/кг при наибольшей его выраженности в дозе 50,0 мкг/кг. После введения пептида GHK в дозе 5,0 мкг/кг наблюдалось увеличение общего времени ($p=0,045$) и общей дистанции в центре лабиринта ($p=0,018$). Таким образом, животные данной группы предпочитали оставаться на центральной площадке и не выбирали более темный закрытый «рукав» лабиринта, что может также указывать на наличие анксиолитического эффекта пептида.

В группе животных, получавших пептид PGP в дозах 0,5 и 50,0 мкг/кг, статистически значимых отличий от контрольной группы не обнаружено. После введения PGP в дозе 5,0 мкг/кг общее время на центральной площадке превышало таковое в контрольной группе в 1,9 раза ($p=0,012$). При этом дистанция в центре у животных данной группы также была увеличена, однако данные различия не были статистически достоверными ($p=0,062$). Таким образом, анксиолитические эффекты у пептида PGP в данном случае не были выявлены. Пептид GHK-PGP во всех использованных

Таблица 1. Анксиолитический эффект пептидов GHK, PGP, GHK-PGP у крыс в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, Me (Q1–Q3)
Table 1. Anxiolytic effect of GHK, PGP, and GHK-PGP peptides in rats in an elevated plus maze test, Me (Q1–Q3)

Показатель	Контроль	GHK 0,5 мкг/кг	GHK 5,0 мкг/кг	GHK 50,0 мкг/кг	PGP 0,5 мкг/кг	PGP 5,0 мкг/кг	PGP 50,0 мкг/кг	GHK-PGP 0,5 мкг/кг	GHK-PGP 5,0 мкг/кг	GHK-PGP 50,0 мкг/кг
Заходы в открытые «рукава»	2 (0–6)	6 (3–10)	3,5 (3–5)	3 (2–5)	3 (1–5)	2 (1–5)	4,5 (2–5)	2 (1–5)	2 (0–6)	4 (2–6)
Заходы в закрытые «рукава»	13 (8–22)	19 (11–21)	21 (10–37)	13,5 (6–19)	19 (11–28)	17 (9–21)	9 (7–25)	22 (11–27)	18 (12–25)	15 (9–30)
Общее время в открытых «рукавах» (сек)	3,6 (2,1–48,3)	73,8 (19,8–114,2)	39,3 (11,9–56,2)	69,2 (26,4–91,1)*	20,4 (2,3–24,4)	13,3 (8,8–48,1)	10,6 (3,1–28,8)	6,8 (4,6–48,6)	14,7 (4–47)	43,1 (12,5–58,9)
Общее время в закрытых «рукавах» (сек)	256,4 (157–276)	162,6 (111,1–215,0)*	186,8 (158,4–209,7)	174,9 (154,2–222,2)	198,6 (184,5–232,9)	181,4 (152–220,8)	232,6 (182,1–249,6)	210,6 (196,2–236,5)	215,3 (206,9–225,7)	205,8 (183,3–234,3)
Время нахождения в центре (сек)	40,3 (20,1–74,8)	73,1 (55,3–82,6)	73 (55,6–94,8)*	49,9 (37,6–58)	51,6 (43,8–76,4)	76,8 (66,6–102,4)*	47,3 (32,7–77,4)	58,9 (34,7–82,3)	66,9 (35,5–81,9)	56,4 (32,9–62,8)
Свешивания	5 (3–15)	12 (10–16)*	9 (5–10)	12 (5–14)	9 (5–12)	7,5 (6–10)	7,5 (5–10)	9 (4–12)	6 (5–8)	8,5 (3–10)
Дистанция в открытых «рукавах» (см)	16,2 (9,5–258,3)	278,3 (81,4–487,2)	136,4 (50,7–267)	303,2 (98,3–410,3)*	84,1 (9,3–268,3)	47,8 (37,1–296,6)	53,5 (18,4–153,8)	30,7 (13,3–213,6)	53,5 (10,9–215,7)	159,5 (39,6–229,6)
Дистанция в закрытых «рукавах» (см)	1140,9 (955,8–1155,2)	903,7 (761,5–1044,3)	1087,6 (960,61469,9)	969,4 (877,6–1502,8)	1171,4 (1074,6–1414,4)	859,1 (829,1–1189,2)	1033,7 (799,6– 1317,1)	1085,3 (806,9–1298,4)	1090,2 (877,8–1157,9)	976,1 (894,3–1164)
Дистанция в центре (см)	203,9 (89,6–252,3)	285,5 (224,9–313,6)	340,9 (253,7–374,9)*	246,9 (174,3–289,6)	218,4 (192,2–411,7)	278,3 (225,5–481,4)	218,4 (135,8–352,2)	259,6 (203,3–284,8)	279,7 (134,9–305,3)	215,4 (150–238,9)

Примечание (здесь и далее): * — $p \leq 0,05$ — статистически значимое отличие по сравнению с контрольной группой.
Note (hereinafter): * — $p \leq 0,05$ — statistically significant difference compared to the control group.

дозах не оказывал влияния на исследованные показатели поведения в лабиринте.

В группе, получавшей пептид GHK-GP в дозе 0,5 мкг/кг, уменьшалось общее время в закрытых «рукавах» (в 1,8 раза, $p=0,015$) при значительном его увеличении в открытых «рукавах» (в 9,3 раза, $p=0,016$) (рис. 1). Общая пройденная дистанция в открытых

«рукавах» ($p=0,016$) и в центре лабиринта ($p=0,033$) (рис. 2), число заходов животных в открытые «рукава» ($p=0,028$) (рис. 3) также существенно превышали их значения в контрольной группе. Увеличение числа свешиваний с края открытых «рукавов» лабиринта ($p=0,024$) у животных данной группы может свидетельствовать

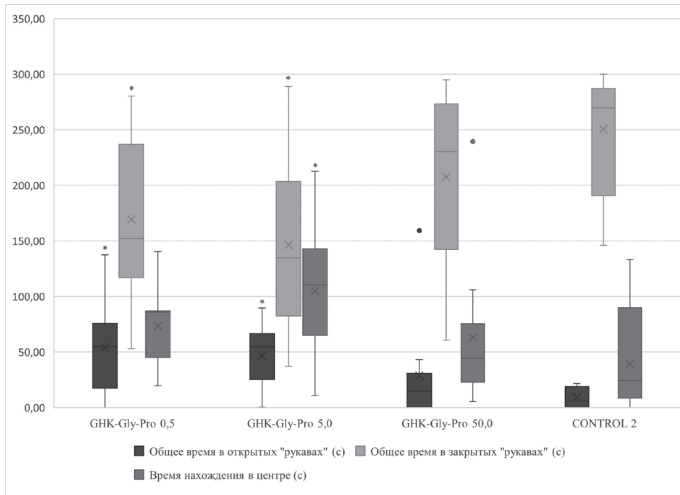


Рис. 1. Анксиолитический эффект пептида GHK-GP (общее время нахождения в открытых «рукавах», закрытых «рукавах» и в центре), Me (Q1–Q3).

Fig. 1. Anxiolytic effect of GHK-GP peptide (total time spent in open arms, closed arms, and in the center), Me (Q1–Q3).

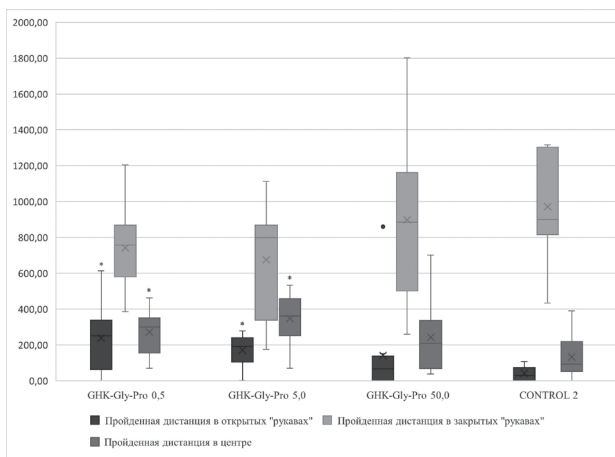


Рис. 2. Анксиолитический эффект пептида GHK-GP (пройденная дистанция в открытых «рукавах», закрытых «рукавах» и в центре), Me (Q1–Q3).

Fig. 2. Anxiolytic effect of GHK-GP peptide (distance traveled in open arms, closed arms, and in the center), Me (Q1–Q3).

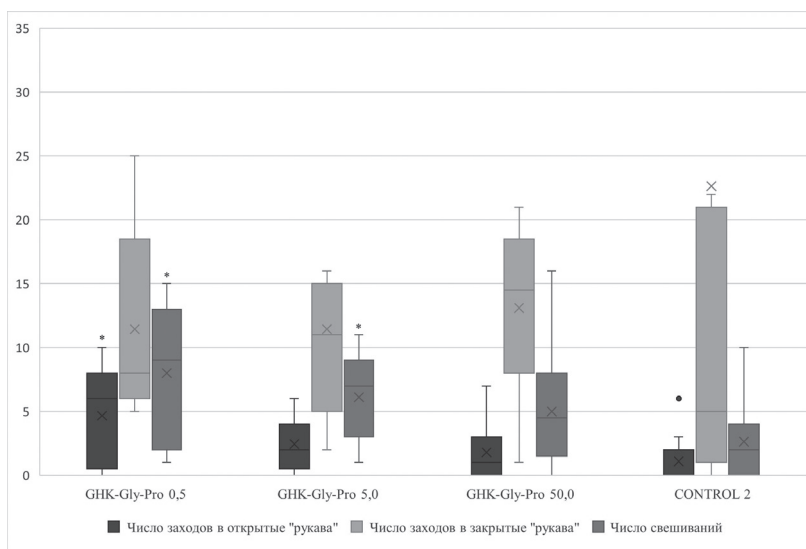


Рис. 3. Анксиолитический эффект пептида GHK-GP (число заходов в открытые «рукава», число заходов в закрытые «рукава», число свешиваний), Me (Q1–Q3).

Fig. 3. Anxiolytic effect of GHK-GP peptide (number of entries into open arms, number of entries into closed arms, number of hangings), Me (Q1–Q3).

о большей исследовательской активности в новой обстановке и меньшем стрессорном напряжении. Подобные результаты получены в группе животных, получавших пептид GHK-GP в дозе 5,0 мкг/кг: общая пройденная дистанция в открытых «рукавах» и в центре лабиринта существенно превышала контрольные значения ($p=0,005$ и $p=0,007$ соответственно) на фоне тенденции к снижению общей дистанции в закрытых «рукавах» ($p=0,081$). Общее время нахождения в центре ($p=0,022$) и открытых «рукавах» ($p=0,002$) значимо превышало таковое в контрольной группе (в 4,5 и в 9,3 раза соответственно), тогда как время в закрытых «рукавах» было в два раза меньше ($p=0,010$). Также у животных данной группы отмечались более частые свешивания с края открытых участков лабиринта ($p=0,027$). Полученные данные свидетельствуют о выраженном анксиолитическом эффекте пептида GHK-GP в дозах 0,5 и 5,0 мкг/кг. В дозе 50,0 мкг/кг какой-либо статистически значимый эффект исследуемых показателей

отсутствовал. В основе данного эффекта может лежать ряд механизмов, обусловленных как молекулой GHK-GP, так и образующейся в результате протеазной деградации последовательности Gly-Pro. Таким образом, пептид GHK-GP в дозах 0,5 и 5,0 мкг/кг при ненаказуемом поведении в приподнятом крестообразном лабиринте оказывает выраженное анксиолитическое действие.

У животных, получавших пептид GHK-P в дозе 0,5 мкг/кг, наблюдалось большее количество заходов в открытые «рукава» лабиринта ($p=0,049$) на фоне тенденции к уменьшению общего времени в закрытых «рукавах» ($p=0,080$) (табл. 2). В группе, получавшей GHK-P в дозе 5,0 и 50,0 мкг/кг, все исследованные показатели существенно не изменялись. Пептид GHK-VER во всех использованных дозах анксиолитического действия не оказывал.

Закключение

Пептид GHK в дозах 0,5; 5,0 и 50,0 мкг/кг обладал анксиолитическим эффектом,

Таблица 2. Анксиолитический эффект пептидов GHK-P, GHK-VER у крыс в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, Me (Q1–Q3)

Table 2. Anxiolytic effect of GHK-P and GHK-VER peptides in rats in an elevated plus maze test, Me (Q1–Q3)

Показатель	Контроль	GHK-P 0,5 мкг/кг	GHK-P 5,0 мкг/кг	GHK-P 50,0 мкг/кг	GHK-VER 0,5 мкг/кг	GHK-VER 5,0 мкг/кг	GHK-VER 50,0 мкг/кг
Заходы в открытые «рукава»	0 (0–2)	2 (1–4)*	0 (0–0)	1 (0–5)	1 (0–3)	2 (0–3)	1 (0–3)
Заходы в закрытые «рукава»	5 (1–21)	11 (3–12)	9 (6–12)	6,5 (6–30)	11 (8–15)	7 (2–23)	8 (4–10)
Время в открытых «рукавах» (сек)	5,9 (0–19)	15,0 (5,2–36,6)	0,7 (0–7,1)	3,7 (0–24)	17,1 (0–45,5)	3,9 (0–15,8)	21,2 (0–30,2)
Время в закрытых «рукавах» (сек)	269,6 (190,6–287,1)	232,5 (153–249,2)	256,3 (226,3–269,3)	252,6 (106,5–295,9)	230,2 (192,2–281,1)	213,6 (174,5–293,7)	252,8 (244,6–285,5)
Время в центре (сек)	24,3 (8,4–89,9)	58,4 (31,0–71,6)	42,8 (19,6–53,9)	44,1 (4,1–94,5)	44 (10,2–87,1)	68,1 (6,3–110,1)	20,2 (14,4–35,1)
Свешивания	2 (0–4)	3 (3–5)	2 (0–5)	1 (0–7)	4,5 (2–9)	5,5 (1–6)	3 (1–5)
Дистанция в открытых «рукавах» (см)	28,9 (0–73,5)	91,2 (17,3–107,4)	3,3 (0–38)	14,7 (0–141,8)	103,5 (0–168,3)	11,4 (0–82,9)	72,9 (0–174,5)
Дистанция в закрытых «рукавах» (см)	901 (814,4–1303,8)	858,9 (683,9–1102,3)	690,2 (603,9–923,5)	882,4 (484,9–1008,2)	832,7 (643,9–1322,6)	865 (617,6–1036,5)	916,7 (734,3–10312,7)
Дистанция в центре (см)	92,9 (51,65–219,4)	176,2 (115,0–275,8)	129,2 (83,1–246,1)	192,1 (21,7–380,3)	198,4 (68,4–286,6)	209,8 (37–435,4)	88,7 (74,3–149,8)

что согласуется с данными предыдущих исследований [2]. Пептид GHK-GP оказывает выраженное анксиолитическое действие в дозах 0,5 и 5,0 мкг/кг, что свидетельствует о его потенцировании эффектов GHK при присоединении к ее С-концу аминокислотной последовательности Gly-Pro. При этом анксиолитическое действие

пептидов PGP, GHK-PGP, GHK-P и GHK-VER не было выявлено. Следовательно, пептидные последовательности PGP, VER и аминокислота пролин при присоединении к С-концу трипептида GHK полностью нивелируют его анксиолитический эффект в тесте с ненаказуемым поведением в приподнятом крестообразном лабиринте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Бобынцев И.И., Чернышёва О.И., Долгинцев М.Е., Смахтин М.Ю., Бельх А.Е. Влияние пептида Gly-His-Lys и его аналогов на болевую чувствительность у мышей. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015;78(1):13–15. [Bobyntsev I.I., Chernysheva O.I., Dolgintsev M.E., Smakhtin M.Y., Belykh A.E. Vliyanie peptida Gly-His-Lys i ego analogov na bolevuyu chuvstvitel'nost' u myshej [The effect of the Gly-His-Lys peptide and its analogues on pain sensitivity in mice]. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Russian journal of experimental and clinical pharmacology]. 2015;78(1):13–15. (In Russian)]. DOI: 10.30906/0869-2092-2015-78-1-13-15.
- Бобынцев И.И., Чернышёва О.И., Долгинцев М.Е., Смахтин М.Ю., Бельх А.Е. Исследование анксиолитических эффектов пептида Gly-His-Lys и его аналогов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014;158(12):684–687. [Bobyntsev I.I., Chernysheva O.I., Dolgintsev M.E., Smakhtin M.Y., Belykh A.E. Issledovanie anksioliticheskikh effektiv peptida Gly-His-Lys i ego analogov [Anxiolytic effects of Gly-His-Lys peptide and its analogs]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014;158(12):684–687. (In Russian)].
- Миронов А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012:944. [Mironov A.N. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [Guidelines for preclinical studies of drugs]. Chast' pervaya [Part one]. Moscow: Grif i K Publ., 2012:944. (In Russian)].
- Рахметова К.К., Мишина Е.С., Бобынцев И.И., Бежин А.И., Ворвуль А.О. Влияние пептида Gly-His-Lys-D-Ala на процессы регенерации при кожной ране. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2023;176(9):399–404. [Rakhmetova K.K., Mishina E.S., Bobyntsev I.I., Bezhin A.I., Vorvul A.O. Vliyanie peptida Gly-His-Lys-D-Ala na processy regeneratsii pri kozhnoy rane [Effects of Gly-His-Lys-D-Ala peptide on skin wound regeneration processes]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023;176(9):399–404. (In Russian)]. DOI: 10.47056/0365-9615-2023-176-9-399-404.

5. Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. Устойчивость пролинсодержащих пептидов в биологических средах. *Биомедицинская химия*. 2019;65(3):180–201. [Shevchenko K.V., Nagaev I.Y., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F. Ustojchivost' prolinsoderzhashhih peptidov v biologicheskikh sredah [Stability of proline peptides in biological fluids]. *Biomedical chemistry*. 2019;65(3):180–201. (In Russian)]. DOI: 10.18097/PBMC20196503180.
6. Banks W.A. Peptides and the blood-brain barrier. *Peptides*. 2015;72:16–19. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.03.010.
7. Lau J.L., Dunn M.K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(10):2700–2707. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.
8. Pickart L. Regenerative and protective actions of the GHK-Cu peptide in the light of the new gene data. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(7):1987. DOI: 10.3390/ijms19071987.
9. Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., Margolina A. The Effect of the Human Peptide GHK on Gene Expression Relevant to Nervous System Function and Cognitive Decline. *Brain Sciences*. 2017;7(2):20. DOI: 10.3390/brainsci7020020.
10. Siméon A., Emonard H., Hornebeck W., Maquart F.X. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺ stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sciences*. 2000;67(18):57–65. DOI: 10.1016/S0024-3205(00)00803-1.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Алферова Марина Евгеньевна*, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: mmarinusya@mail.ru

Marina E. Alferova*, Kursk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: mmarinusya@mail.ru

Бобынцев Игорь Иванович, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: bobig@mail.ru

Igor I. Bobyntsev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Kursk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: bobig@mail.ru

Ворвуль Антон Олегович, к.м.н., ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: vorvul1996@mail.ru

Anton O. Vorvul, Cand. Sci. (Med.), Kursk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: vorvul1996@mail.ru

Тенькова Анна Николаевна, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: tenkova.85@mail.ru

Anna N. Tenkova, Kursk State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: tenkova.85@mail.ru

Андреева Людмила Александровна, ФГБУ «Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”»;
e-mail: landr@img.ras.ru

Lyudmila A. Andreeva, National Research Centre “Kurchatov Institute”;
e-mail: landr@img.ras.ru

Мясоедов Николай Федорович, д.х.н., проф., акад. РАН, ФГБУ «Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”»;
e-mail: nfm@img.ras.ru

Nikolay F. Myasoedov, Dr. Sci. (Chem.), Prof., Acad. of the Russian Academy of Sciences, National Research Centre “Kurchatov Institute”;
e-mail: nfm@img.ras.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

МОДЕЛЬ ГЕСТАЦИОННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА И ЕЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ВАЛИДАЦИЯ

А.С. Соломина*, К.С. Качалов, А.В. Родина, А.Д. Дурнев, Л.Г. Колик

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»
125315, Российская Федерация, Москва, Балтийская ул., 8

В предшествующих исследованиях было показано, что сочетанное воздействие кратковременной пищевой нагрузки и внутрибрюшинного введения неионогенного сурфактанта тилкосапола во второй половине беременности крыс приводит к нарушению толерантности к глюкозе при ее нормальном уровне натощак или умеренном повышении в крови, что можно расценить как состояние, соответствующее гестационному сахарному диабету (ГСД), при котором возникают повреждения ДНК в клетках эмбрионов и нарушения пре- и постнатального развития потомства крыс. Предполагаемая биомодель ГСД требовала фармакологической верификации, которая была выполнена с использованием гипогликемических препаратов метформина и глимепирида. Препараты вводили с первого дня беременности перорально в 1% растворе крахмала. Оценивали способность каждого из них снижать или устранять нарушение толерантности к глюкозе и/или умеренную гипергликемию, отклонения в развитии потомства, повреждения ДНК в эмбриональных тканях, изменения мышечного тонуса и формирования безусловных рефлексов в неонатальном периоде, а также поведение взрослого потомства в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Распознавание нового объекта», «Открытое поле» и других. Метформин в дозе 250 мг/кг проявил слабовыраженную способность снижать нарушение толерантности к глюкозе у беременных крыс и уменьшать уровни повреждений ДНК в эмбриональных клетках и был практически неактивен в других тестах. Глимепирид в дозе 4 мг/кг эффективно устранял нарушение углеводного обмена у беременных крыс, снижал поврежденность ДНК в клетках печени и мозга плодов, повышал выживаемость потомства и корректировал поведенческие отклонения у потомства. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о пригодности рассматриваемой экспериментальной модели для поиска средств фармакологической коррекции ГСД и его осложнений у потомства.

Ключевые слова: гестационный сахарный диабет, ДНК-повреждения, фетотоксичность, метформин, глимепирид, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Соломина А.С., Качалов К.С., Родина А.В., Дурнев А.Д., Колик Л.Г. Модель гестационного сахарного диабета и ее фармакологическая валидация. *Биомедицина*. 2025;21(2):58–70. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-58-70>

Поступила 09.04.2025

Принята после доработки 05.05.2025

Опубликована 10.06.2025

GESTATIONAL DIABETES MELLITUS MODEL AND ITS PHARMACOLOGICAL VALIDATION

Anna S. Solomina*, Kirill S. Kachalov, Anastasia V. Rodina, Andrey D. Durnev, Larisa G. Kolik

Federal Research Center for Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies
125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya Str., 8

Previous studies have shown the combined effect of short-term nutritional intake and intraperitoneal administration of the nonionic surfactant tyloxapol in the second half of pregnancy in rats on impaired glucose tolerance at its normal fasting level or a moderate increase in blood. This can be regarded as a condition corresponding to gestational diabetes mellitus (GDM), in which DNA damage occurs in embryo cells along with the disorders of the pre- and postnatal development of rat offspring. The proposed GDM biomodel had required pharmacological verification, which was performed in our study using hypoglycemic drugs metformin and glimepiride. The drugs were administered orally from the first day of pregnancy in a 1% starch solution. We assessed the capacity of each drug to reduce or eliminate impaired glucose tolerance and/or moderate hyperglycemia, developmental abnormalities in offspring, DNA damage in embryonic tissues, changes in muscle tone, and formation of unconditioned reflexes in the neonatal period. The behavior of adult offspring was assessed using elevated plus maze, novel object recognition, open field, and others tests. Metformin at a dose of 250 mg/kg showed a weak capacity to reduce impaired glucose tolerance in pregnant rats and to reduce DNA damage levels in embryonic cells, showing no action in other tests. Glimepiride at a dose of 4 mg/kg effectively eliminated carbohydrate metabolism disorders in pregnant rats, reduced DNA damage in fetal liver and brain cells, increased offspring survival, and corrected behavioral abnormalities in offspring. Thus, the results obtained indicate the feasibility of the analyzed experimental model when searching for means of pharmacological correction of GDM and its complications in offspring.

Keywords: gestational diabetes mellitus, DNA damage, fetotoxicity, metformin, glimepiride, rats

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

For citation: Solomina A.S., Kachalov K.S., Rodina A.V., Durnev A.D., Kolik L.G. Gestational Diabetes Mellitus Model and its Pharmacological Validation. *Journal Biomed.* 2025;21(2):58–70. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-58-70>

Submitted 09.04.2025

Revised 05.05.2025

Published 10.06.2025

Введение

Согласно статистическим данным Международной федерации диабета (IDF) гестационный сахарный диабет (ГСД) в 2021 году выявлен у 16% беременных в мире [25]. Развитие ГСД может происходить при чрезмерном влиянии неблагоприятных средовых факторов, нарушении гомеостаза в организме беременной либо в результате комбинации внешних (экто-) и внутренних (эндо-) факторов, которые можно обозначить как «эндо-/экзо-экспозом» (рис. 1). ГСД опасен для материнского организма и потомства риском последующих метаболических, сердечно-сосудистых патологий и нейрорасстройствами, такими как тревожные расстройства [14], снижение интеллектуального развития, расстройства аутистического спектра, синдром дефицита внимания и гиперактивности [15, 22]. Степень выраженности

осложнений ГСД у потомства широко варьирует вплоть до инвалидизации.

Феномен ГСД активно и широко исследуется, лечение этого заболевания не имеет общепризнанных подходов. Чаще всего предлагаются изменения образа жизни (диета и физическая активность) с или без инсулинотерапии. Оба подхода имеют ряд недостатков, среди которых низкая комплаентность терапии и высокий риск гипогликемии [2].

Актуальность поиска лекарственных средств для предупреждения и терапии ГСД неоднократно отмечалась в литературе [10]. Подобная работа может строиться на экспериментальных исследованиях с использованием релевантных и верифицированных биологических моделей ГСД. Ранее нами была предложена модель ГСД у крыс с применением кратковременной пищевой высококалорийной нагрузки и введением

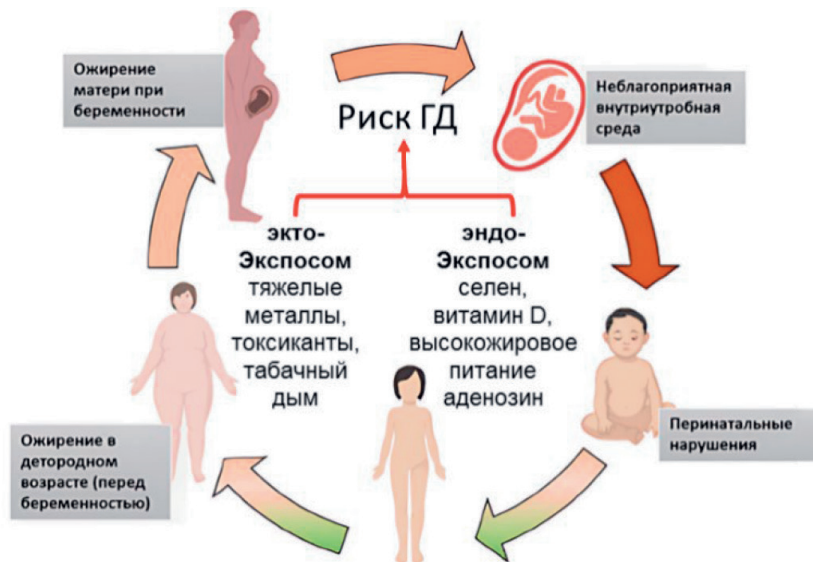


Рис. 1. Риск развития гестационного сахарного диабета под влиянием экто- и эндо-экспосом (модифицировано по: Valero P., et al. *Exposome and foetoplacental vascular dysfunction in gestational diabetes mellitus. Molecular Aspects of Medicine.* 2022;87:101019).

Fig. 1. Risk of developing gestational diabetes mellitus under the influence of ecto- and endo-exposome (modified from: Valero P., et al. *Exposome and foetoplacental vascular dysfunction in gestational diabetes mellitus. Molecular Aspects of Medicine.* 2022;87:101019).

неионогенного сурфактанта тилоксапола во второй половине беременности при разных режимах, отражающая основные патогномонические признаки заболевания [16]. Дополнительно к этому оценивали уровни повреждений ДНК, которые в ряде работ клинического профиля отмечаются при перманентной и транзиторной гипергликемии [7].

Цель работы — фармакологически верифицировать модель ГСД с использованием лекарственных препаратов метформина и глимепирида, широко используемых при лечении сахарного диабета 2-го типа.

Материалы и методы

Самок крыс Wistar ($m=200\text{--}220$ г, 8–10 недель) из питомника филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России содержали и использовали в эксперименте согласно требованиям национальных и междуна-

родных стандартов [3, 4, 9] и локальной этической Комиссии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

ГСД моделировали содержанием крыс на высококалорийной диете (ВКД), состоящей из корма с 57% животного жира, 12% углеводов и 10% р-ра сахарозы в качестве источника жидкости, 4 недели до беременности и 3 недели на протяжении беременности. Первый день беременности (ДБ) определяли по наличию сперматозоидов в вагинальном мазке. Животным внутрибрюшинно вводили тилоксапол (Triton WR-1339, CAS Number: 25301-02-4, Sigma-Aldrich) в дозе 200 мг/кг трехкратно на 14, 17 и 20 ДБ или четырехкратно на 14, 16, 18 и 20 ДБ. Многократность введения тилоксапола обусловлена обратимостью гиперлипидемического и гипергликемического эффектов, длительность которой составляет 48 ч [10]. Контрольную

группу крыс содержали на стандартном корме и фильтрованной воде *ad libitum*, фосфатно-солевой буфер вводили внутрибрюшинно в аналогичные ДБ.

В исследовании использованы гипогликемические препараты метформин в дозе 250 мг/кг (Сиофор® 500, ООО «Берлин-Хеми/А.Менарини», Россия) из группы бигуанидов и глимепирид в дозе 4 мг/кг («Вертекс», Россия), производное сульфонилмочевины третьего поколения. Дозы препаратов для крыс соответствовали терапевтическим, рекомендуемым при лечении СД 2-го типа у человека. Расчет доз проводили с учетом действующего вещества и с применением коэффициента пересчета исходя из поверхности тела [1]. Метформин или глимепирид в виде суспензии 1% крахмала вводили ежедневно перорально с 1 ДБ в объеме 0,5 мл/200 г массы тела. Оценку влияния метформина и глимепирида на нарушение толерантности к глюкозе, уровень ДНК-повреждений и антенатальные нарушения проводили на модели ГСД с четырехкратным введением тилоксапола, тогда как действие препаратов на постнатальные отклонения определяли в модели ГСД с трехкратным введением тилоксапола. Выбранные режимы моделирования ГСД подробно обсуждались в предыдущей публикации [8] и связаны с увеличением неонатальной гибели потомства, развивающегося на фоне ГСД.

На 21 ДБ у животных определяли уровень глюкозы натощак и оценивали толерантность к глюкозе проведением внутривенного глюкозотолерантного теста (ВГТТ) [12] с использованием глюкометра Diacont (Россия) в точках 0, 10, 60 мин.

Часть животных, которым вводили тилоксапол трехкратно, оставляли для получения потомства. Крыс, которые получали тилоксапол четырехкратно, подвергали некропии для оценки антенатального развития потомства [6].

ДНК-повреждения регистрировали методом ДНК-комет в щелочной версии [5],

забирая биоматериал у трёх плодов из помета с последующим анализом не менее 100 ДНК-комет с использованием программного обеспечения CASP1.2.2.

У потомства в раннем постнатальном периоде исследовали сенсорно-двигательные рефлексы «переворачивания на плоскости» и «избегания края» и мышечный тонус в тесте «горизонтальная веревочка» на 5-й день жизни (ПНД5). У взрослого потомства самок и самцов после ПНД60 оценивали поведение в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПНД65), «Распознавание нового объекта» (ПНД70), «Открытое поле» (ПНД73), «Y-лабиринт с пищевым подкреплением» (ПНД80) [8, 11].

Статистическую обработку проводили с использованием демоверсии программы GraphPad Prism. Нормальность распределения данных проверяли оценивали критерием Шапиро — Уилкса. При негауссовском распределении данных использовали ранговый критерий Манна — Уитни и Краскела — Уоллиса с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Сравнение частотных показателей зависимых выборок осуществляли с применением точного критерия Фишера. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

У животных контрольной группы содержание глюкозы в крови составило 4,4 ммоль/л. У крыс с ГСД выявлено значимое повышение глюкозы до 5,8 ммоль/л при трехкратном введении тилоксапола и до 7,6 ммоль/л при его четырехкратном применении. Умеренная гипергликемия, характерная для ГСД, достоверно снижалась введением метформина и глимепирида до 6,1 и 5,7 ммоль/л соответственно при сравнении с концентрацией глюкозы в крови при четырехкратном введении тилоксапола.

Результаты проведения ВГТТ отражены на рис. 2. Расчетные величины площади

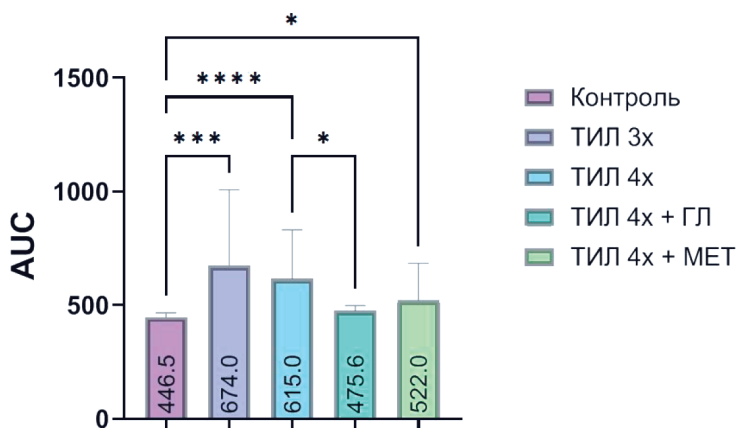


Рис. 2. Влияние метформина и глимегирида на нарушение толерантности к глюкозе в модели ГСД на 21-й день беременности.

Примечание: ТИЛ 3x — трёхкратный режим введения тилоксапола в дозе 200 мг/кг; ТИЛ 4x — четырёхкратный режим введения тилоксапола в дозе 200 мг/кг; ГЛ — глимегирид; MET — метформин; AUC — площадь под кривой; данные представлены в виде медиан групп; значимые межгрупповые различия при * — $p \leq 0,05$, *** — $p \leq 0,001$, **** — $p \leq 0,0001$.

Fig. 2. Effects of metformin and glimepiride on impaired glucose tolerance in the GDM model on the 21st day of gestation.

Note: ТИЛ 3x — triple administration of tyloxapol at a dose of 200 mg/kg; ТИЛ 4x — four-time regimen of tyloxapol administration at a dose of 200 mg/kg; ГЛ — glimepiride; MET — metformin; AUC — area under the curve; data are presented as median groups; significant intergroup differences at * — $p \leq 0,05$, *** — $p \leq 0,001$, **** — $p \leq 0,0001$.

под кривой (AUC) при трёхкратном и четырёхкратном введении тилоксапола значимо превышали показатели контрольной группы. В совокупности с повышением глюкозы в крови натощак до умеренных значений нарушение толерантности к глюкозе позволяет констатировать развитие у беременных крыс состояния, характерного для ГСД.

На рис. 3 представлен внешний вид плодов при макроскопическом осмотре на 21 ДБ. В модели ГСД, а также после использования метформина в дозе 250 мг/кг на фоне ГСД обнаруживались погибшие на позднем сроке плоды (1–2 мертвых плода в помете) (рис. 3В), в то время как у животных, получавших глимегирид в дозе 4 мг/кг, погибших плодов не обнаруживалось (рис. 3С). При внешнем осмотре живых плодов аномалий развития не выявлено ни в одной из групп.

После макроскопического осмотра у плодов забирали биоматериал для оценки уровня ДНК-повреждений. В модели ГСД при четырёхкратном введении тилоксапола показатель «% ДНК в хвосте» значимо повышался в 2,9 раза в плаценте, в 2,4 раза в печени плодов и в 2,5 раза в мозге плодов по сравнению с контрольными данными (рис. 4). При использовании метформина в дозе 250 мг/кг показатели поврежденности ДНК во всех исследованных образцах были незначительно и не значимо ниже, чем при ГСД, и достоверно превышали контрольные значения.

Глимегирид в дозе 4 мг/кг значимо и практически полностью устранял генотоксический эффект в печени плодов, снижая регистрируемые показатели 2,7 раза, в мозге плодов — 4,1 раза по сравнению экспериментальной группой ГСД, но не снижал поврежденность ДНК в плаценте.

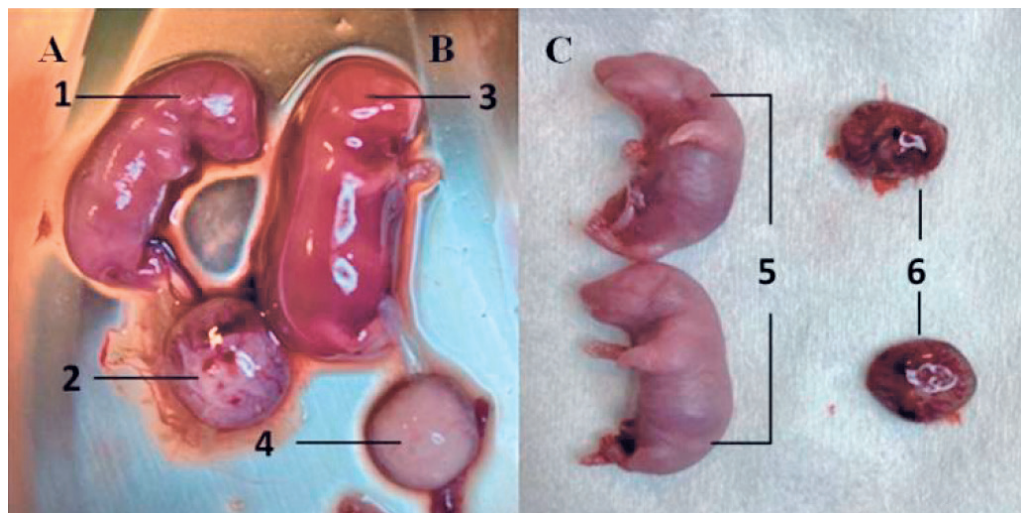


Рис. 3. Внешний макроскопический осмотр плодов на 21-й день беременности.

Примечание: А — плод контрольной группы; В — тилоксапол трехкратно; С — глимепирид. 1 — живой плод контрольной группы, 2 — плацента живого плода контрольной группы, 3 — погибший плод опытной группы ГСД, 4 — плацента погибшего плода опытной группы ГСД, 5 — живые плоды из группы, получавшей глимепирид на фоне ГСД, 6 — плацента живых плодов из группы, получавшей глимепирид на фоне ГСД.

Fig. 3. External macroscopic examination of fetuses on the 21st day of gestation.

Note: А — fetus of the control group; В — triple administration of tyloxapol; С — glimepiride. 1 — live fetus of the control group, 2 — placenta of the live fetus of the control group, 3 — dead fetus of the experimental GDM group, 4 — placenta of the dead fetus of the experimental GDM group, 5 — live fruits from the group with GDM receiving glimepiride, 6 — placenta of live fruits from the group with GDM receiving glimepiride.

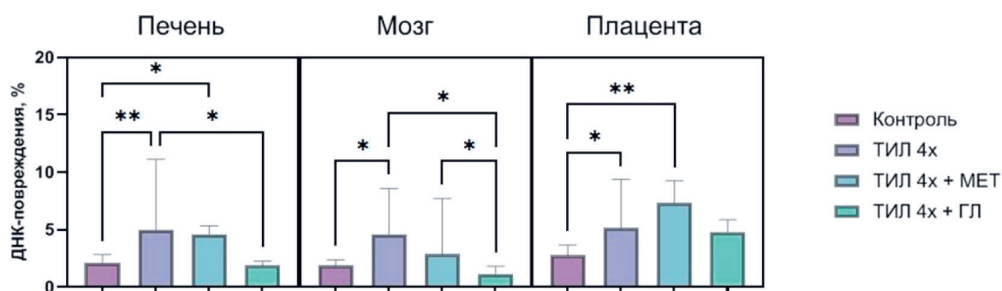


Рис. 4. Влияние метформина и глимеперида на уровень поврежденности ДНК при ГСД на 21-й день беременности.

Примечание: ТИЛ 4x — четырёхкратный режим введения тилоксаполя в дозе 200 мг/кг; ГЛ — глимепирид; MET — метформин. Данные представлены в виде медиан групп; значимые межгрупповые различия при * — $p \leq 0,05$, ** — $p \leq 0,01$.

Fig. 4. Effects of metformin and glimepiride on the level of DNA damage in GDM on the 21st day of gestation.

Note: ТИЛ 4x — four-time regimen of tyloxapol administration at a dose of 200 mg/kg; ГЛ — glimepiride; MET — metformin. Data are presented as median groups; significant intergroup differences at * — $p \leq 0.05$, ** — $p \leq 0.01$.

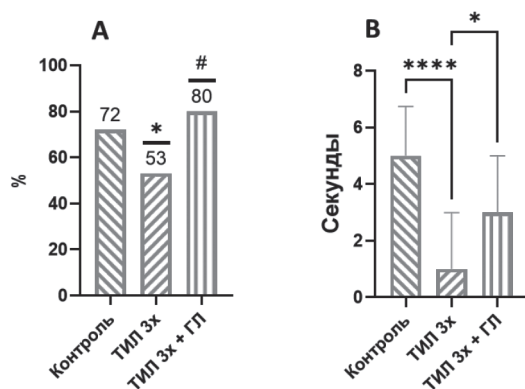


Рис. 5. Результаты исследования раннего постнатального развития потомства на фоне ГСД в тесте «отползание от края» (А) и «горизонтальная веревочка» (В).

Примечание: ТИЛ 3x — трёхкратный режим введения тилоксапола в дозе 200 мг/кг; ГЛ — глимепирид; данные представлены в виде медиан групп; значимые межгрупповые различия при * — $p \leq 0,05$, **** — $p \leq 0,0001$ при сравнении с контрольной группой; # $p \leq 0,05$ — при сравнении с группой ГСД.

Fig. 5. Data on early postnatal development of offspring in the setting of GDM in the “crawling away from the edge” (A) and “horizontal rope” (B) tests.

Note: ТИЛ 3x — triple administration of tyloxapol at a dose of 200 mg/kg; ГЛ — glimepiride; data are presented as median groups; significant intergroup differences at * — $p \leq 0,05$, **** — $p \leq 0,0001$ when compared with the control group; # $p \leq 0,05$ when compared with the GDM group.

На рис. 5 отражены данные по наблюдению за ранним постнатальным периодом развития потомства. У крысят от крыс с ГСД при трехкратном введении тилоксапола наблюдалось значимое снижение мышечного тонуса в тесте «горизонтальная веревочка». При введении глимепирида в дозе 4 мг/кг время удерживания на «горизонтальной веревочке» достоверно повышалось у крысят модельной группы ГСД.

Становление рефлекса «переворачивание на плоскости» отмечено у 100,0% крысят контрольной группы, у 86,8% крысят, полученных от самок с ГСД, и у 85,1% крысят от самок с ГСД, получавших глимепирид в дозе 4 мг/кг, однако эти результаты не были статически значимыми. Рефлекс «оползание от края» был сформирован у 72% крысят контрольной группы. У крысят от самок с ГСД этот показатель составил 53% и был достоверно ниже контрольного. Введение глимепирида в дозе 4 мг/кг значительно повышало долю крысят, отползавших от края, до 80% (рис. 5).

У этого же потомства крыс после 60 ПНД оценивали поведенческий статус. Самки опытной группы с ГСД в тесте ПКЛ характеризовались повышением тревожности, значимо меньше пребывая в открытых «рукавах» и больше времени находясь в закрытых «рукавах» лабиринта.

Глимепирид в дозе 4 мг/кг достоверно повышал время нахождения в открытых «рукавах» и снижал время пребывания в закрытых, что является свидетельством снижения тревожности самок потомства.

В тесте РНО самки потомства от крыс с ГСД демонстрировали нарушение непространственной кратковременной памяти, проводя больше времени у знакомого объекта. На фоне введения глимепирида в дозе 4 мг/кг у крыс возрастал интерес к новому объекту, и индекс распознавания нового объекта повышался до регистрируемого в контрольной группе.

Поведение самок потомства из группы с ГСД в тесте ОП характеризовалось значимым снижением горизонтальной двига-

тельной активности, указывая на повышение стрессуемости животных в новой обстановке. Применение глимепирида повышало горизонтальную двигательную активность в незнакомой среде ($p < 0,05$).

В тесте Y-ПП у самок на фоне ГСД рефлекс на условный стимул (пищу) при депривации формировался медленнее по сравнению с контрольной группой. Эти крысы неохотно обследовали лабиринт в поисках пищи, что проявлялось увеличением времени до нахождения пищи, что отчасти может обуславливаться повышенной тревожностью и стрессуемостью, затрудняющими адаптацию в новой обстановке. Значимое увеличение времени до достижения пищевого подкрепления у этих самок регистрировалось и на последнем, третьем дне тестирования.

Глимепирид в дозе 4 мг/кг повышал обучаемость животных в ответ на условный стимул, и время, затраченное крысами на поиск пищи в лабиринте, в последний день тестирования было сопоставимо с контрольными показателями (рис. 6).

Результаты оценки поведения самцов потомства от крыс с ГСД представлены на рис. 7. В используемых тестах самцы потомства демонстрировали схожие с самками поведенческие отклонения. Так, в тесте ПКЛ у самцов опытной группы ГСД зарегистрировано значимое снижение времени пребывания в открытых «рукавах».

Глимепирид в дозе 4 мг/кг достоверно повышал время, проведенное самцами в открытых «рукавах» лабиринта, что указывало на снижение тревожности. Кратковременная непространственная память самцов потомства, определяемая по ИР, была значимо ниже у контрольных животных. При использовании глимепирида значение индекса распознавания повышалось по сравнению с опытной группой ГСД, что, однако, не было статистически значимо.

В тесте ОП у самцов аналогично самкам потомства от крыс с ГСД наблюдалось достоверное уменьшение горизонтальной двигательной активности в сравнении с контрольной группой, говоря о снижении адаптации в незнакомой

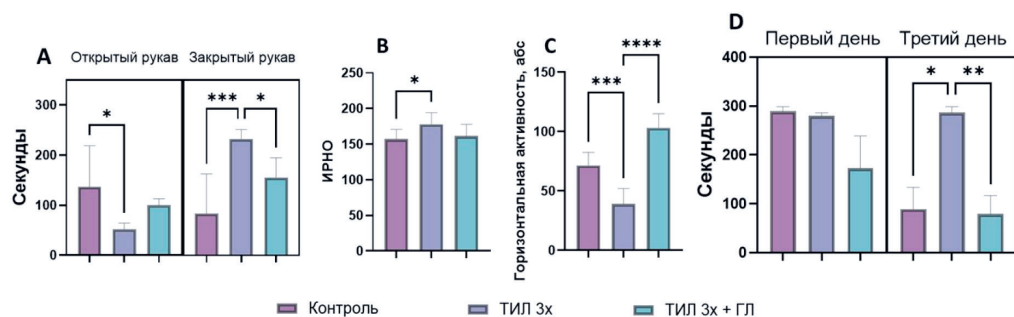


Рис. 6. Влияние глимепирида на поведение самок потомства крыс с ГСД в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (А), «Распознавание нового объекта» (В), «Открытое поле» (С) и «Y-лабиринт с пищевым подкреплением» (D).

Примечание: ТИЛ 3х — трёхкратный режим введения тилоксаполя в дозе 200 мг/кг; ГЛ — глимепирид; ИРНО — индекс распознавания нового объекта; данные представлены в виде медиан групп; значимые межгрупповые различия при * — $p \leq 0,05$, ** — $p \leq 0,01$, *** — $p \leq 0,001$, **** — $p \leq 0,0001$.

Fig. 6. Effects of glimepiride on the behavior of female offspring of rats with GDM in the “elevated plus maze” (A), “novel object recognition” (B), “open field (C), and “Y-maze with food reinforcement” (D) tests.

Note: ТИЛ 3х — triple administration of tyloxapol at a dose of 200 mg/kg; ГЛ — glimepiride; ИРНО — new object recognition index; data are presented as median groups; significant intergroup differences at * — $p \leq 0,05$, ** — $p \leq 0,01$, *** — $p \leq 0,001$, **** — $p \leq 0,0001$.

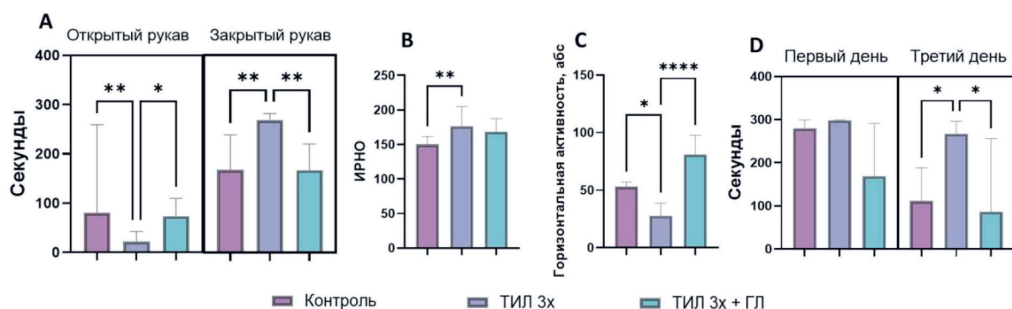


Рис. 7. Влияние глимепирида на поведение самцов потомства крыс с ГСД в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (А), «Распознавание нового объекта» (В), «Открытое поле» (С) и «Y-лабиринт с пищевым подкреплением» (D).

Примечание: ТИЛ 3х — трёхкратный режим введения тилоксаполя в дозе 200 мг/кг; ГЛ — глимепирид; ИРНО — индекс распознавания нового объекта; данные представлены в виде медиан групп; значимые межгрупповые различия при * — $p \leq 0,05$, ** — $p \leq 0,01$, **** — $p \leq 0,0001$.

Fig. 7. The effect of glimepiride on the behavior of male offspring of rats with GDM in the “elevated plus maze” (A), “novel object recognition” (B), “open field (C), and “Y-maze with food reinforcement” (D) tests.

Note: ТИЛ 3х — triple administration of tyloxapol at a dose of 200 mg/kg; ГЛ — glimepiride; ИРНО — new object recognition index; data are presented as median groups; significant intergroup differences at * — $p \leq 0,05$, ** — $p \leq 0,01$, **** — $p \leq 0,0001$.

обстановке. Введение глимепирида способствовало повышению горизонтальной активности у самцов опытной группы ГСД ($p < 0,05$).

В Y-ПП самцы потомства от крыс с ГСД демонстрировали сложность в освоении условного рефлекса. Животные затрачивали достоверно больше времени на достижение пищевого подкрепления, что отчетливо проявилось на последнем дне тестирования увеличением времени до нахождения пищи. Глимепирид значимо снижал этот показатель, нормализовывая адаптационные способности грызунов.

Таким образом, сочетание кратковременной высококалорийной пищевой нагрузки с внутрибрюшинным введением тилоксаполя в дозе 200 мг/кг трехкратно или четырехкратно повышает уровень глюкозы в крови и нарушает толерантность к глюкозе у беременных крыс, что сопровождается возникновением отклонений у потомства. В антенатальном периоде у потомства на фоне ГСД увеличивается уровень ДНК-повреждений в плаценте, печени и головном мозге и снижается выживаемость.

В неонатальном периоде у потомства снижается мышечный тонус и замедляется формирование безусловных рефлексов. Результаты поведенческого тестирования взрослого потомства от самок с ГСД указывают на наличие отклонений, проявляющихся повышенной тревожностью, нарушением кратковременной памяти, снижением адаптационных и когнитивных способностей, которые согласуются с эпидемиологическими данными последствий ГСД у потомства [14, 15, 21]. В этой связи отдельно следует отметить важность мониторинга глюкозы во второй половине беременности и оценки толерантности к глюкозе, т. к. неблагоприятные последствия в неонатальном и постнатальном периодах возникают даже при относительно невысокой гипергликемии.

Использование метформина в дозе 250 мг/кг с 1 ДБ незначительно снижало нарушенную при ГСД толерантность к глюкозе. Показатели поврежденности ДНК при введении метформина в дозе 250 мг/кг были хоть и немного ниже модельной группы ГСД, но значимо превышали

контрольные в 2,7 раза в плаценте, в 2,2 раза в печени и в 1,5 раза в мозге плодов. Кроме того, у крыс с ГСД, получавших метформин, регистрировалась низкая выживаемость крысят в неонатальном периоде, что не позволило провести дальнейшие наблюдения за развитием потомства. Глимепирид в дозе 4 мг/кг, в отличие от метформина в дозе 250 мг/кг, эффективно и — в большинстве случаев — до контрольных значений уменьшал нарушения у беременных крыс и потомства, индуцированные ГСД: устранял нарушение толерантности к глюкозе, ДНК-повреждения в эмбриональных клетках, увеличивал выживаемость крысят в антенатальном и постнатальном периодах, корректировал изменения поведения у взрослого потомства.

Метформин и производное сульфонилмочевины первого поколения глибенкламид (Глибурид®) — единственные препараты, изучаемые клинически у беременных женщин с ГСД в мировом масштабе [14]. Согласно данным [19, 20] при использовании метформина наблюдались благоприятные исходы беременности наряду с быстрым гликемическим контролем, особенно у пациенток с избыточным весом. Вместе с тем неэффективность метформина в качестве монотерапии у женщин с ГСД подтверждается рядом клинических исследований [23] и, согласно рекомендациям авторов, требует дополнительной инсулинотерапии [2]. Применение глибурида характеризовалось наиболее эффективным контролем гликемии у беременных с нормальным весом, но в ряде случаев отмечались неблагоприятные исходы беременности [24].

Вместе с этим результаты клинических наблюдений весьма противоречивы, что не позволяет однозначно судить об эффективности того или иного препарата. Кроме того, способность глимепирида снижать симптомы и проявления ГСД отме-

чена только в экспериментальных работах на СТЗ-модели диабета [18]. Тем не менее выявленная способность глимепирида снижать нарушения у крыс с ГСД согласуется с клиническими исследованиями по сравнению фармакологических эффектов инсулина и производных сульфонилмочевины у беременных [13], демонстрирующих их сопоставимость в антигипергликемическом действии. Однако, принимая во внимание удобство применения пероральных лекарственных форм, особенно у беременных, выбор в пользу глимепирида вполне очевиден.

Несмотря на включение в арсенал противодиабетических средств относительно новых и высокоэффективных лекарственных препаратов из класса агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (Оземпик®), использование представителей этого класса в терапии ГСД не представляется возможным по причине репродуктивной токсичности, проявляющейся задержкой роста плодов, аномалиями скелета и внутренних органов у плодов и эмбриональностью [17]. Поэтому при выборе стратегий лечения ГСД предпочтение следует отдавать препаратам, в отношении которых накоплен значительный опыт применения у человека, не обладающим материнской токсичностью, эмбрио- и фетотоксическим действиями.

Заключение

Таким образом, результаты, полученные при фармакологической валидации модели, в целом подтверждают возможность ее использования для поиска новых гипогликемических препаратов и/или эффективных и безопасных стратегий, снижающих или устраняющих последствия ГСД. Кроме того, полученные данные указывают на очевидные преимущества глимепирида при купировании эффектов ГСД в предлагаемой биологической модели.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Арзамазцев Е.В., Березовская И.В., Верстакова О.Л., Гуськова Т.А., Дурнев А.Д., Иванова А.С., Крепкова Л.В., Сорокина А.В. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012:13–24. [Arzamatzsev E.V., Berезovskaya I.V., Verstakova O.L., Gus'kova T.A., Durnev A.D., Ivanova A.S., Krepkova L.V., Sorokina A.V. Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya lekarstvennykh sredstv [Guidelines for the study of the general toxic effect of medicines]. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya* [Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part One]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012:13–24. (In Russian)].
2. Белоцерковцева Л.Д., Коваленко Л.В., Добрынина И.Ю., Конченкова Е.Н. Современный взгляд на проблему лечения гестационного сахарного диабета. *Вестник СурГУ. Медицина*. 2020;1(43):49–58. [Belotserkovtseva L.D., Kovalenko L.V., Dobrynya I.Yu., Konchenkova E.N. Sovremennyy vzglyad na problemu lecheniya gestatsionnogo sakharnogo diabeta [A modern view on the problem of treatment of gestational diabetes mellitus]. *Vestnik SurGU. Meditsina*. [Bulletin SurGU. Meditsine]. 2020;1(43):49–58. (In Russian)].
3. ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Межгосударственный стандарт. М.: Стандартинформ, 2019. [GOST 33044-2014 «Printsipy nadlezhachei laboratornoi praktiki» [GOST 33044-2014 «Principles of good laboratory practice»]. Mezghosudarstvennyy Standart [Interstate standard]. Moscow: Standartinform Publ., 2019. (In Russian)].
4. ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание). Межгосударственный стандарт. М.: Стандартинформ, 2019. [GOST 33215-2014 «Rukovodstvo po soderzhaniiyu i ukhodu za laboratornymi zhivotnymi. Pravila oborudovaniya pomeshchenii i organizatsii protsedur» (Pereizdanie) [GOST 33215-2014 «Guidelines for accommodation and care of animals. Rules for the equipment of premises and the organization of procedures». (Reissue)]. Mezghosudarstvennyy Standart [Interstate standard]. Moscow: Standartinform Publ., 2019. (In Russian)].
5. Дурнев А.Д., Меркулов В.А., Жанатаев А.К., Никитина В.А., Воронина Е.С., Середенин С.Б. Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012:115–128. [Durnev A.D., Merkulov V.A., Zhanataev A.K., Nikitina V.A., Voronina E.S., Seredenin S.B. Metodicheskie rekomendatsii po otsenke DNK-povrezhdeniy metodom shchelochного gel'-elektroforeza otdel'nykh kletok v farmakologicheskikh issledovaniyakh [Methodological recommendations for the assessment of DNA damage by alkaline gel electrophoresis of individual cells in pharmacological studies]. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya* [Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part One]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012:115–128. (In Russian)].
6. Дурнев А.Д., Смольникова Н.М., Скосырева А.М., Немова Е.П., Соломина А.С., Шредер О.В., Гуськова Т.А., Верстакова О.Л., Сюзаев Р.Д. Методические указания по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012:80–93. [Durnev A.D., Smol'nikova N.M., Skosyeva A.M., Nemova E.P., Solomina A.S., Shreder O.V., Gus'kova T.A., Verstakova O.L., Syubaev R.D. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu reproduktivnoi toksichnosti lekarstvennykh sredstv [Guidelines for the study of reproductive toxicity of medicines]. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya* [Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part One]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012:80–93. (In Russian)].
7. Ерёмина Н.В., Жанатаев А.К., Лисицын А.А., Дурнев А.Д. Генотоксические маркеры у больных сахарным диабетом (обзор литературы). *Экологическая генетика*. 2021;19(2):143–168. [Eremina N.V., Zhanataev A.K., Lisitsyn A.A., Durnev A.D. Genotoksicheskie markery u bol'nykh sakharnym diabedom (obzor literatury) [Genotoxic markers in patients with diabetes mellitus (literature review)]. *Ecological Genetics*. 2021;19(2):143–168. (In Russian)].
8. Качалов К.С., Соломина А.С., Родина А.В. Репродуктивные нарушения у матерей и потомства крыс при моделировании гестационного диабета высококалорийной диетой в сочетании с тилоксаполом. *Биомедицина*. 2024;20(3E):191–196. [Kachalov K.S., Solomina A.S., Rodina A.V. Reproduktivnye narusheniya u materei i potomstva krys pri modelirovaniy gestatsionnogo diabeta vysokokaloriinoy dietoi v sochetanii s tiloksaполоm [Reproductive disorders in mothers and offspring of rats in gestational diabetes modelled with a high-calorie diet in combination with tyloxapol]. *Biomedicina* [Journal Biomed]. 2024;20(3E):191–196. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-20-3E-191-196.
9. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обра-

- учения лекарственных средств». [Reshenie Soveta Evraziiskoi ekonomicheskoi komissii ot 3 noyabrya 2016 № 81 «Ob utverzhdenii pravil nadležashchei laboratornoi praktiki Evraziiskogo ekonomicheskogo soyuza v sfere obrashcheniya lekarstvennykh sredstv» [The Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated November 3, 2016 No. 81 «On approval of the rules of good laboratory practice of the Eurasian Economic Union in the field of circulation of medicines»]. (In Russian)].
10. Сокова Е.А., Бунятян Н.Д., Мазеркина И.А., Демидова О.А., Александрова Т.В. Клинические исследования лекарственных средств у беременных: отношение ожидаемой пользы к возможному риску? *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2015;(4):26–31. [Sokova E.A., Bunyatyan N.D., Mazerkina I.A., Demidova O.A., Aleksandrova T.V. Klinicheskie issledovaniya lekarstvennykh sredstv u beremennykh: otnoshenie ozhidaemoi pol'zy k vozmozhnomu risku? [Clinical trials of medicines in pregnant women: the ratio of expected benefit to possible risk?]. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* [Statement of the Scientific Center for Expertise of Medical Products]. 2015;(4):26–31. (In Russian)].
 11. Соломина А.С., Шредер Е.Д., Колик Л.Г., Дурнев А.Д. Исследование влияния фабомотизола на поведенческие нарушения у потомства крыс, подвергнутых действию табачного дыма и этанола. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2018;(2):3–11. [Solomina A.S., Shreder E.D., Kolik L.G., Durnev A.D. Issledovanie vliyaniya fabomotizola na povedencheskie narusheniya u potomstva kryss, podvergnutykh deistviyu tabachnogo dyma i etanola [Influence of fabomotizole on behavioral disturbances in rat offspring exposed to cigarette smoke or ethanol]. *Pharmakokinetics and Pharmacodinamics*. 2018;(2):3–11. (In Russian)]. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10008.
 12. Спасов А.А., Воронкова М.П., Снигур Г.Л., Тибирькова Е.В., Проскурина И.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению пероральных лекарственных средств для лечения сахарного диабета. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012:672–686. [Spasov A.A., Voronkova M.P., Snigur G.L., Tibir'kova E.V., Proskurina I.A. Metodicheskie rekomendatsii po doklinicheskomu izucheniyu peroral'nykh lekarstvennykh sredstv dlya lecheniya sakharnogo diabeta [Methodological recommendations for the preclinical study of oral medicines for the treatment of diabetes mellitus]. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya* [Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part One]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012:672–686. (In Russian)].
 13. Affres H., Senat M.V., Letourneau A., Deruelle P., Coustols-Valat M., Bouchghoul H., Bouyer J. Glyburide therapy for gestational diabetes: Glycaemic control, maternal hypoglycaemia, and treatment failure. *Diabetes & Metabolism*. 2021;47(4):101210. DOI: 10.1016/j.diabet.2020.11.002.
 14. Alves J.M., Smith A., Chow T., Negriff S., Carter S., Xiang A.H., Page K.A. Prenatal exposure to gestational diabetes mellitus is associated with mental health outcomes and physical activity has a modifying role. *Res Sq*. 2023;rs.3.rs-3290222. DOI: 10.21203/rs.3.rs-3290222/v1.
 15. Chen S., Zhao S., Dalman C., Karlsson H., Gardner R. Association of maternal diabetes with neurodevelopmental disorders: autism spectrum disorders, attention-deficit/hyperactivity disorder and intellectual disability. *International Journal of Epidemiology*. 2021;50(2):459–474. DOI: 10.1093/ije/dyaa212.
 16. De Sousa J.A., Pereira P., da Costa Allgayer M., Marroñi N.P., Ferraz A.D.B.F., Picada J.N. Evaluation of DNA damage in Wistar rat tissues with hyperlipidemia induced by tyloxapol. *Exp. Mol. Pathol*. 2017;103(1):51–55. DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.06.009.
 17. Drummond R.F., Seif K.E., Reece E.A. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist use in pregnancy: a review. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2025;232(1):17–25. DOI: 10.1016/j.ajog.2024.08.024.
 18. Esubi J.U., Olojede S.O., Lawal S.K., Medubi L.J., Adekoya A.J., Dauda F.F., Olusegun A.P., Osinubi A.A. Comparative studies on safety of glimepiride and glipizide on renal microarchitecture and oxidative stress markers of pregnant streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *J. Pharm. Pharmacol. Res*. 2019;3(1):003–018. DOI: 10.26502/jppr.0016.
 19. Gereade A., Domali E., Chatzakis C., Margioulas-Siarkou C., Petousis S., Stavros S., Nikolettos K., Gouveri E., Sotiriou S., Tsikouras P., Dinas K., Nikolettos N., Papanas N., Goulis D.G., Sotiriadis A. (Metformin for Treating Gestational Diabetes: What Have We Learned During the Last Two Decades? *A Systematic Review*. *Life*. 2025;15(1):130. DOI: 10.3390/life15010130.
 20. Guo L., Ma J., Tang J., Hu D., Zhang W., Zhao X. Comparative efficacy and safety of metformin, glyburide, and insulin in treating gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. *J. Diabetes Res*. 2019;2019:9804708. DOI: 10.1155/2019/9804708.
 21. Perea V., Urquiza X., Valverde M., Macias M., Carmo A., Esteve E., Escibano G., Pons N., Gimenez O., Girones T., Simo-Servat I., Domenech A., Alonso-Carril N., Quirós C., Amor A.J., Lopez E., Barahona M.J. Influence of maternal diabetes on the risk of neurodevelopmental disorders in offspring in the prenatal and postnatal periods. *Diabetes Metab. J*. 2022;46(6):912–922. DOI: 10.4093/dmj.2021.0340.
 22. Sacks K.N., Friger M., Shoham-Vardi I., Abokaf H., Spiegel E., Sergienko R., Landau D., Sheiner E. Prenatal exposure to gestational diabetes mellitus as an independent risk factor for long-term neuropsychiatric morbidity of the offspring. *Am. J. Obstet Gynecol*. 2016;215(3):380.e1. DOI: 10.1016/j.ajog.2016.03.030.
 23. Tripathi R., Tyagi S., Goel V. Metformin in gestational diabetes mellitus. *Indian J. Med. Res*. 2017;145(5):588–591. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_1572_16.

24. Zeng Y.C., Li M.J., Chen Y., Jiang L., Wang S.M., Mo X.L., Li B.Y. The use of glyburide in the management of gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. *Advances in medical sciences*. 2014;59(1):95–101. DOI: 10.1016/j.advms.2014.03.001.
25. <https://idf.org/about-diabetes/gestational-diabetes/>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Соломина Анна Сергеевна*, к.б.н., ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: solomina_as@academpharm.ru

Anna S. Solomina*, Cand. Sci. (Biol.), Federal Research Center for Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: solomina_as@academpharm.ru

Качалов Кирилл Сергеевич, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: kachalov_ks@academpharm.ru

Kirill S. Kachalov, Federal Research Center for Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: kachalov_ks@academpharm.ru

Родина Анастасия Владимировна, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: rodina_av@academpharm.ru

Anastasia V. Rodina, Federal Research Center for Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: rodina_av@academpharm.ru

Дурнев Андрей Дмитриевич, д.м.н., проф., член-корр. РАН, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: durnev_ad@academpharm.ru

Andrey D. Durnev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center for Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: durnev_ad@academpharm.ru

Колик Лариса Геннадьевна, д.б.н., проф., ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;
e-mail: kolik_lg@academpharm.ru

Larisa G. Kolik, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Federal Research Center for Original and Promising Biomedical and Pharmaceutical Technologies;
e-mail: kolik_lg@academpharm.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС-САМЦОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ УРЕТАНА

Н.Ю. Тимофеева*, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, О.Ю. Кострова,
И.С. Стоменская, Е.В. Москвичев

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»
428015, Российская Федерация, Чувашская Республика, Чебоксары, Московский пр-т, 15

Надпочечники представляют собой эндокринный орган, участвующий в регуляции практически всех жизненно важных процессов в организме. Работа основных структурных элементов надпочечников — кортикоцитов и хромоффинных клеток — во многом зависит от клеточного микроокружения. Известно, что в структуру паренхимы надпочечников входят лимфоциты, макрофаги, мастоциты и другие клетки. Уретан является одним из химических стрессоров, который способен влиять на структуру надпочечников. В данной статье представлено изучение изменений клеточного состава надпочечников при действии уретана. Выявлено, что однократное внутрибрюшинное введение уретана крысам-самцам приводит к изменениям в структуре надпочечников в виде уменьшения числа пролиферирующих клеток и мастоцитов, увеличения числа фибробластов и макрофагов и инфильтрации органа лимфоцитами, преимущественно NK-клетками.

Ключевые слова: надпочечники, уретан, лимфоциты, макрофаги, мастоциты, виментин

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Тимофеева Н.Ю., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Кострова О.Ю., Стоменская И.С., Москвичев Е.В. Клеточный состав надпочечников крыс-самцов при введении уретана. *Биомедицина*. 2025;21(2):71–80. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-71-80>

Поступила 05.11.2024

Принята после доработки 08.04.2025

Опубликована 10.06.2025

CELLULAR COMPOSITION OF MALE RAT ADRENAL GLANDS UPON URETHANE ADMINISTRATION

Natalia Yu. Timofeeva*, Gleb Yu. Struchko, Larisa M. Merkulova, Olga Yu. Kostrova,
Irina S. Stomenskaya, Evgenij V. Moskvichev

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

The adrenal glands are an endocrine organ involved in the regulation of almost all vital processes in the body. Functioning of the main structural elements of the adrenal glands – corticocytes and chromaffin cells – largely depends on the cellular microenvironment. It is known that the structure of the adrenal parenchyma includes lymphocytes, macrophages, mastocytes, and other cells. Urethane is a chemical stressor that can affect the structure of the adrenal gland. This paper presents a study of the changes in the cellular composition of the adrenal glands under the administration of urethane. It was found that a single intraperitoneal injection of urethane into male rats leads to changes in the structure of the adrenal glands manifested in a decreased number of proliferating cells and mastocytes, an increased number of fibroblasts and macrophages, and infiltration of the organ with lymphocytes, mainly NK-cells.

Keywords: adrenal glands, urethan, lymphocytes, macrophages, mastocytes, vimentin

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

For citation: Timofeeva N.Yu., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Kostrova O.Yu., Stomenskaya I.S., Moskvichev E.V. Cellular Composition of Male Rat Adrenal Glands upon Urethane Administration. *Journal Biomed.* 2025;21(2):71–80. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-2-71-80>

Submitted 05.11.2024

Revised 08.04.2025

Published 10.06.2025

Введение

Надпочечники представляют собой важный эндокринный орган, который обеспечивает нейрогуморальную регуляцию углеводного, белкового, липидного, водно-солевого обмена, работу сердечно-сосудистой, иммунной и эндокринной систем [2, 5]. Надпочечники одними из первых реагируют на любое воздействие внутренней или внешней среды. Помимо адренокортикоцитов, в паренхиме надпочечников выявляются макрофаги, лимфоциты, мастоциты и клетки — предшественники адренокортикоцитов. Все типы клеток, присутствующие в железе, оказывают влияние на адренокортикоциты [21, 32]. Эти взаимодействия осуществляются чаще всего через биологически активные пептиды и катехоламины, преимущественно за счет их прямого действия на соседние клетки или паракринным путем. Возникающие в результате взаимодействия процессы играют важную роль в регуляции функций клеток надпочечников, включая пролиферацию, дифференцировку, функционирование и апоптоз эндокринных клеток, как в физиологических, так и в патологических условиях [21, 32].

Показано существование стволовых клеток, расположенных в капсуле, и клеток-предшественников, смешанных с кластерами клеток, продуцирующих альдостерон в клубочковой зоне, в частности в надпочечниках человека и мыши [20, 25]. Кроме того, пролиферирующие Ki-67⁺-клетки были обнаружены в пучковой зоне в надпочечниках мыши, крысы и человека [7].

Различные типы иммунных клеток, включая макрофаги, лимфоциты и мастоциты, способны проникать в кору надпочечников человека в периваскулярных областях, рядом со стероидогенными клетками [9]. Они участвуют в контроле функции надпочечников за счет высвобождения факторов роста для клеточной пролиферации и уничтожения апоптотических клеток. Известно также, что иммунные клетки регулируют секрецию стероидов, в частности при сепсисе [10, 14, 15].

Мастоциты повсеместно распространены в организме и играют решающую роль при аллергических заболеваниях, реакциях иммунитета и воспалении [30]. В надпочечниках мастоциты, положительные на CD117 и триптазу и окрашивающиеся толуидиновым синим, визуализируются под соединительнотканной капсулой и в клубочковой зоне, что, вероятнее всего, связано с продукцией фактора роста в этой области [9, 23].

Макрофаги составляют основную субпопуляцию иммунных клеток, локализация которых зависит от пола, главным образом от наличия Х-зоны коры надпочечников. Инфильтрация коркового вещества надпочечников макрофагами была замечена в надпочечниках человека, крысы и мыши [6, 13]. Макрофаги с ультраструктурными характеристиками лизосомальной активности особенно многочисленны в пучковой и сетчатой зонах, причем последняя является областью с высоким уровнем апоптоза клеток [6]. У крыс плотность

макрофагов в пучковой и сетчатой зонах увеличивается с возрастом и после лечения дексаметазоном, вызывая регрессию коры [6]. Усиление активности макрофагов может привести к удалению стероидогенных мертвых клеток посредством процесса фагоцитоза и атрофии коры в ответ на лечение глюкокортикоидами [6]. Сообщалось как о воспалении, так и об инфильтрации CD68⁺-макрофагами при аденомах, продуцирующих кортизол [18], что позволяет предположить, что этот тип иммунных клеток может контролировать рост опухоли надпочечников [26].

Многочисленные исследования продемонстрировали присутствие лимфоцитов вблизи клеток коры надпочечников человека, что способствует паракринным связям между двумя типами клеток. Показано, что цитокины, высвобождаемые лимфоцитами, модулируют стероидогенез надпочечников, в частности для адаптации секреции глюкокортикоидов к инфекционному стрессу [22]. Лимфоциты стимулируют секрецию андрогенов клетками сетчатой зоны [34]. Более того, была обнаружена большая популяция Т-лимфоцитов, ассоциированных с обширным разрушением паренхимы надпочечников у пациентов с болезнью Аддисона, возникающая в результате выработки аутоантител против стероидогенного фермента 21-гидроксилазы [12, 19]. Аналогичным образом сообщалось об инфильтрации коры надпочечников многочисленными Т-лимфоцитами на гуманизированной модели мыши после лечения ингибиторами противоопухолевых контрольных точек, которые вызывают побочные эффекты, связанные с аутоиммунными заболеваниями [33]. Такой процесс инфильтрации Т-лимфоцитами позволяет понять механизм, ответственный за адrenaлит у пациентов, получающих иммунотерапию от рака [24, 31]. Эти наблюдения указывают на то, что Т-лимфоциты участвуют в элиминации клеток коры надпочеч-

ников на фоне аутоиммунных заболеваний. Инфильтрация надпочечников иммунными клетками также наблюдалась при неопухолевых заболеваниях. Фактически недавнее посмертное гистологическое исследование показало инфильтрацию надпочечников CD3⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами у пациентов с коронавирусной инфекцией (COVID-19) [35].

Одним из сильных химических стрессоров является уретан. Он обладает выраженным канцерогенным эффектом, связанным с образованием винилкарбаматного эпоксида, который образует ковалентно связывающиеся с ДНК мутагенные аддукты [4, 17]. Повсеместность его распространения (в ферментированных пищевых продуктах и алкогольных напитках, применение в производстве многих химикатов, лаков, красок, полиуретанов, лекарственных препаратов) и его роль в развитии онкологических заболеваний легких обуславливают актуальность исследования его влияния на структуру надпочечников. Показано, что химический канцерогенез, вызванный уретаном, оказывает влияние на лимфоциты и мастоциты в легких [27]. Однако данных о том, что уретан оказывает влияние на изменение этих клеток в надпочечниках, нет. Изучение морфологии надпочечников при введении уретана является актуальной задачей клеточной биологии, эндокринологии и онкологии.

Цель исследования — изучить изменения клеточного состава надпочечников при введении уретана.

Материалы и методы

Работа выполнена на 50 крысах-самцах популяции линий Wistar в возрасте 3 мес. на начало эксперимента и исходной массой тела 180–200 г. К завершению опыта возраст крыс составил 9 мес. Животные получены из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Условия содержания и обращение

с используемыми в эксперименте животными соответствовали Директиве Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. «О защите животных, которых используют для научных целей» (2010/63/EU), Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (ЕЭС, Страсбург, 1985), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ЕЭС, Страсбург, 1986). Исследование было одобрено на заседании Локального этического комитета ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова». На период эксперимента животные содержались в виварии медицинского факультета ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» в настольных клетках по 6 крыс со свободным доступом к воде и пище. В эксперименте использованы конвенционные животные.

Крысы были разделены на две группы. Первая (контрольная) — интактные (n=10). Вторая (опытная) — самцы с однократным внутрибрюшинным введением уретана в дозе 1 г/кг массы тела крысы, который индуцирует канцерогенез легких (n=40). Выведение животных из эксперимента с забором надпочечников крыс проводилось через 30, 60, 90 и 180 дней после введения канцерогена путем цервикальной декапитации с применением телазола из расчета 15 мг/кг внутримышечно.

Иммуногистохимическое исследование с использованием моноклональных и поликлональных антител: к Ki-67 — маркеру активности пролиферации (“Dako”, Дания); к p53 — маркеру апоптоза (“Leica”, Великобритания); к виментину — белку мезенхимального происхождения для оценки фиброгенеза, антигену зрелых мезенхимальных клеток, прежде всего фибробластов (“Leica”, Великобритания); к кластеру дифференцировки лимфо-

цитов 3-го типа — CD3 (для идентификации зрелых Т-лимфоцитов) (“Leica”, Великобритания); к Т-лимфоцитам и NK-клеткам (естественным киллерам) — CD2 (“Leica”, Великобритания), к CD68 — для идентификации макрофагов (“Leica”, Великобритания). Количество NK-клеток определяли путем вычета числа CD3 из числа CD2. Результаты реакций оценивали с использованием микроскопа МИКРОМЕД 3 ЛЮМ путем подсчета положительно окрашенных клеток в 10-ти полях зрения при увеличении ×400, затем их отображали в единицах в поле зрения.

Окраска полихромным толуидиновым синим — для качественной и количественной характеристики мастоцитов надпочечников. По степени дегрануляции мастоциты делят на следующие группы: T0 (недегранулированные клетки) — гранулы плотно расположены в цитоплазме, ядро не визуализируется; T1 (слабо дегранулированные) — гранулы не выходят за пределы клеточной мембраны, ядро хорошо просматривается; T2 (умеренно дегранулированные) — гранулы частично выходят за пределы неповрежденной цитоплазматической мембраны, ядро не визуализируется; T3 (сильно дегранулированные) — полностью дегранулировавшие мастоциты с разорванной цитоплазматической мембраной. Общее количество и различные формы мастоцитов по степени дегрануляции подсчитывали в каждом препарате при увеличении ×400 в 10-ти полях зрения. Высчитывали индекс дегрануляции (ИД) по формуле:

$$\text{ИД} = \frac{(T0 \times 0 + T1 \times 1 + T2 \times 2 + T3 \times 3)}{n},$$

где n — суммарное количество мастоцитов. В качестве статистической величины использовали частоту встречаемости отдельных форм мастоцитов в процентах от их общего количества.

Статистическая обработка полученных цифровых данных осуществлялась с по-

мощью пакета программ Microsoft Office 2019 (Word и Excel) и лицензионного пакета программ Statistica 10. Статистическую достоверность определяли с помощью t-критерия Стьюдента, при несоответствии показателей законам нормального распределения — с помощью критерия Манна — Уитни. Взаимосвязь между изучаемыми параметрами оценивали с помощью непараметрического корреляционного анализа Спирмена (при $p < 0,05$).

Результаты исследований

Иммуногистохимическое исследование позволило выявить клеточный состав надпочечников и определило локализацию иммунопозитивных клеток на маркер мезенхимальных структур виментин во всех структурно-функциональных зонах коркового вещества надпочечников (рис. 1), маркер пролиферативной активности Ki-67 в клубочковой, суданофобной и пучковой зонах (рис. 2), маркер активности апоптоза p53 в сетчатой зоне, зрелых Т-лимфоцитов, естественных киллеров и лимфоцитов CD2 и макрофагов CD68 преимущественно

в пучковой и сетчатой зонах. В мозговом веществе выявлялось лишь незначительное количество CD3⁺, CD2⁺, CD68⁺ и виментин-положительных структур. Индекс пролиферации и апоптоза в этой группе составил $5,85 \pm 0,61$ усл. ед. Соотношение NK-клеток к Т-лимфоцитам составило $6,6 \pm 0,66$ усл. ед.

Однократное введение уретана изменяет иммуногистохимическую картину надпочечников. Так, количество Ki-67⁺-клеток по сравнению с интактной группой уменьшено практически на всех сроках исследования: через 30 дней снижено в 4,32 раза, через 60 дней — в 3,5 раза, через 90 дней, наоборот, увеличено в 1,76 раза, через 180 дней вновь уменьшено в 1,55 раза. Число виментин-позитивных структур через 30 дней снижено в 2,43 раза, через 60 дней увеличено в 2,46 раза, через 90 дней — в 2,6 раза, через 180 дней — в 1,59 раза.

Количество CD2⁺-клеток через 30 и 60 дней не отличается достоверно от интактных, через 90 дней увеличивается в 7,05 раза (при сравнении с предыдущим сроком

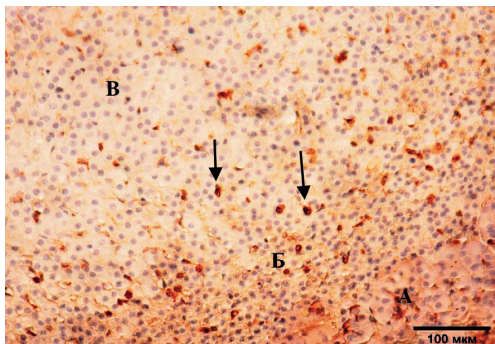


Рис. 1. Надпочечник интактной крысы. Иммунопозитивная реакция на виментин в корковом веществе надпочечников (указаны стрелками): А — мозговое вещество, Б — сетчатая зона, В — пучковая зона. Иммуногистохимическая реакция на виментин. Ув. $\times 400$.
Fig. 1. Adrenal gland of the intact rat. Immunopositive reaction to vimentin in the adrenal cortex (indicated by arrows): А — medulla, Б — reticular zone, В — fascicular zone. Immunohistochemical reaction to vimentin. Magn. $\times 400$.

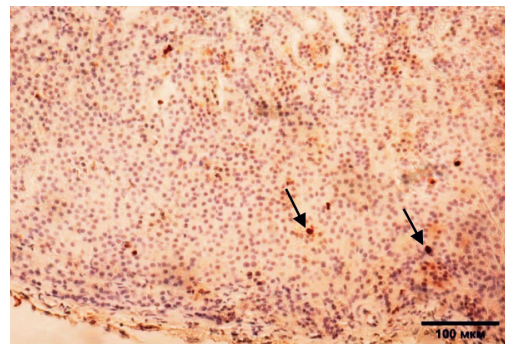


Рис. 2. Надпочечник интактной крысы. Иммунопозитивная реакция на Ki-67 в суданофобной и клубочковой зонах коры надпочечников (указаны стрелками). Иммуногистохимическая реакция на Ki-67. Ув. $\times 400$.
Fig. 2. Adrenal gland of an intact rat. Immunopositive reaction to Ki-67 in the sudanophobic and tubular zones of the adrenal cortex (indicated by arrows). Immunohistochemical reaction to Ki-67. Magn. $\times 400$.

исследования — в 14,9 раза). При этом через 90 дней CD2⁺-клетки локализуются не только в сетчатой, но и в пучковой зоне. Через 180 дней происходит увеличение числа CD2⁺-клеток — в 2,84 раза.

Число p53⁺- и CD3⁺-клеток через 30, 60 и 180 дней достоверно не отличается от интактных. Через 90 дней выявлено уменьшение количества p53⁺-клеток в 1,86 раза и увеличение числа CD3⁺-клеток в 1,5 раза.

Индекс пролиферации и апоптоза в данной группе через 30 дней снижен по отношению к интактным крысам в 2 раза и составляет 3,25±0,56 усл. ед., через 60 дней — в 3 раза и равен 1,49±0,33 усл. ед. Через 90 дней составляет 3,82±0,72 усл. ед., что в 3 раза больше показателя интактных крыс. Через 180 дней показатель достигает уровня интактных животных и составляет 7,22±0,85 усл. ед.

Соотношение NK-клеток к Т-лимфоцитам через 30 дней практически не отличается от интактных значений и составляет 6,3±0,57 усл. ед., через 60 дней меньше интактных в 7 раз и составляет 0,45±0,11 усл. ед., через 90 дней составляет 5,7±0,34 усл. ед., через 180 дней — 0,5±0,1 усл. ед.

Число CD68⁺-клеток практически на всех сроках после однократного введения уретана превышает уровень интактных крыс: через 30 дней — в 2 раза, через 60 дней — не отличается от интактных, через 90 дней — в 2 раза, через 180 дней — в 3 раза.

При окраске срезов полихромным толудиновым синим мастоциты у интактных животных выявляются под капсулой и в жировой клетчатке вокруг надпочечника. По степени дегрануляции у интактных крыс преобладают недегранулированные и сильно дегранулированные клетки, составляя 32 и 58% соответственно. Индекс дегрануляции у этой группы крыс равняется 1,89.

После введения уретана через 30 дней наблюдается уменьшение количества мастоцитов с преобладанием недегранулированных (T0) и сильно дегранулированных (T3)

форм — 25 и 50% соответственно. Индекс дегрануляции в 3 раза меньше, чем у интактных, и равен 0,63. Через 60 дней наблюдается уменьшение числа выявляемых мастоцитов, они определяются в единичном количестве в препаратах надпочечников. Через 90 дней количество мастоцитов увеличивается по сравнению с предыдущим сроком, но не превышает интактную группу. При этом встречаются все виды мастоцитов по степени дегрануляции с преобладанием сильно дегранулированных (T3) — 44%. Индекс дегрануляции увеличивается, однако не достигает уровня интактных животных и равен 1,3. Через 180 дней число мастоцитов уменьшается, обнаруживаются лишь единичные дегранулированные клетки.

Корреляционный анализ через 30 дней после инъекции выявил умеренную положительную корреляционную связь между числом CD3⁺- и виментин-положительных структур ($r=0,6$, $p<0,05$), через 60 дней — сильную положительную корреляционную связь между числом CD3⁺ и виментин-содержащих структур ($r=0,97$, $p<0,05$) (рис. 3), через 180 дней — умеренную положительную корреляционную связь между числом CD2⁺- и числом виментин-содержащих структур ($r=0,47$, $p<0,05$).

Обсуждение результатов

Микросреда адренокортикоцитов представляет собой совокупность различных по своей функции и происхождению клеток. Это микроокружение меняется в ответ на различные воздействия и опосредует реакцию кортикоцитов на воздействия, в т. ч. и на однократное внутрибрюшинное введение крысам-самцам уретана. Так, количество Ki-67⁺-клеток снижается практически на всех сроках исследования, что говорит об уменьшении пролиферативной активности клеток-предшественников. Вероятно, это связано с прямым действием введения уретана на пролиферативную активность клеток надпочечников.



Рис. 3. Корреляционная связь между числом CD3⁺ и числом виментин-позитивных структур через 60 дней после введения уретана.

Fig. 3. Correlation between CD3⁺ count and number of vimentin-positive structures 60 days after urethane administration.

Число виментин-позитивных структур снижается лишь через 30 дней после введения уретана, на остальных сроках эксперимента — увеличивается, что указывает на активизацию процессов фиброгенеза под влиянием уретана и, возможно, связано со склерозированием органа в ответ на его введение [8].

Количество CD2⁺-клеток увеличивается с 90-го дня эксперимента. Согласно данным литературы, выявление лимфоцитарной инфильтрации коркового вещества надпочечников у стареющих крыс и собак рассматривается как признак латентного адrenalита или иммуноопосредованной атрофии надпочечников [16, 29]. Исследование аутопсийных препаратов надпочечников людей старческого и пожилого возраста, не имеющих эндокринных и аутоиммунных расстройств, определяет лимфоцитарную инфильтрацию коркового вещества с преобладанием Т-хелперов в составе инфильтрата, что также характеризуется как развитие адrenalита с аутоиммунным компонентом. Иммуногистохимическое исследование при этом определяет среди

инфильтрирующих мононуклеарных клеток в основном CD3⁺ Т-клетки [11]. Схожие изменения в виде лимфоплазмозитарного адrenalита с преобладанием лимфоцитов выявляются в надпочечниках кошек с гипoadренокортицизмом, обусловленным аутоиммунным заболеванием [28]. В нашем эксперименте выявляется преимущественная инфильтрация органа NK-клетками. Возможно, увеличение числа CD2⁺-клеток является признаком их цитотоксического действия на кортикоциты и развивающегося адrenalита вследствие введения уретана как проявления аутоиммунного процесса. Также инфильтрацию органа лимфоцитами можно объяснить как АКТГ-независимый ответ надпочечников, т. к. лимфоциты сами способны продуцировать АКТГ и интерлейкин-6.

Число p53⁺-клеток снижается через 90 дней. Ген p53 и кодируемый им белок являются регуляторами апоптоза и осуществляют контроль за состоянием клеток. При повреждении ДНК этот ген способен запускать репарацию ДНК или, если

это невозможно, запрограммированную гибель клетки через апоптоз. Выявление этого белка может указывать на высокую интенсивность апоптоза, которая сочетается с высокой клеточной пролиферацией [3], а сниженная экспрессия — с низкой клеточной пролиферацией. В данном случае происходит разбалансировка процессов апоптоза и пролиферации, что, вероятно, связано с действием уретана.

Количество макрофагов увеличивается при введении уретана практически на всех сроках. Возможно, повышение числа макрофагов в надпочечниках напрямую связано с процессами атрофии коры в ответ на введение уретана [6].

Мастоциты реагируют снижением их числа, увеличением дегранулированных форм, но уменьшением индекса дегрануляции. Снижение числа мастоцитов в надпочечниках, вероятно, связано со снижением пролиферативной активности клеток и возможным снижением концентрации фактора роста

в данной области. Показано появление дегрануляции и миграции мастоцитов из тимуса и костного мозга в периферические органы и ткани при воздействии стрессовых факторов, что является одним из важных компонентов адаптационного синдрома при стрессе [1].

Кроме того, выявлена положительная корреляционная связь между числом CD2⁺, CD3⁺ и виментин-позитивных структур, что, вероятно, указывает на связь лимфоцитов с развитием процессов фиброгенеза в надпочечниках.

Закключение

Таким образом, введение уретана влияет на клеточное строение паренхимы надпочечников, что отражается на снижении числа пролиферирующих клеток и мастоцитов и повышении количества фибробластов и макрофагов практически на всех сроках эксперимента и инфильтрации органа, преимущественно НК-лимфоцитами, через 3 и 6 мес.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Арташян О.С. Влияние острой гипоксии на систему тучных клеток крыс. Мат-лы XI Всеросс. науч.-практ. конф. «Молодые ученые в медицине». Казань, 2006:207–208. [Artashyan O.S. Vliyaniye ostroj gipoksii na sistemu tuchnykh kletok kryis [Effect of acute hypoxia on the rat mast cell system]. Mat-ly XI Vseross. nauch.-prakt. konf. "Molodye uchenye v medicine" [Materials of the XI All-Russian Scientific and Practical Conference "Young Scientists in Medicine"]. Kazan, 2006:207–208. (In Russian)].
2. Белик И.А., Удочкина Л.А., Федченко С.Н., Ладыш И.А. Гистоморфометрическое исследование структуры надпочечных желез интактных половозрелых крыс. *Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова*. 2023;21(1):17–19. [Belik I.A., Udochkina L.A., Fedchenko S.N., Ladysh I.A. Gistomorfometricheskoye issledovanie struktury nadpocheknykh zhelez intaknykh polovozrelykh kryis [Organometric parameters of the adrenal glands of rats during the period of readaptation after priming with toluene vapor]. *Morphological Almanac named after V.G. Koveshnikov*. 2023;21(1):17–19. (In Russian)].
3. Москвичев Е.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю. Возрастная и акцидентальная инволюция тимуса. Чебоксары: Изд-во Чуваш. Ун-та, 2015:170. [Moskvichev E.V., Merkulova L.M., Struchko G.Yu. *Vozrastnaya i akcidental'naya involyuciya timusa* [Age-related and accidental involution of the thymus]. Cheboksary: Izd-vo Chuvash. Un-ta, 2015:170. (In Russian)].
4. Нехаева Т.Л., Чернов А.Н., Торопова Я.Г., Галагудза М.М., Балдueva И.А. Разнообразие опухолевых моделей для тестирования противоопухолевой активности веществ у мышей. *Вопросы онкологии*. 2020;66(4):353–363. [Nehaeva T.L., Chernov A.N., Toropova Y.G., Galagudza M.M., Baldueva I.A. Raznoobrazie opuxolevykh modelej dlya testirovaniya protivopuxolevoj aktivnosti veshchestv u myshej [Diversity of tumour models for testing antitumour activity of substances in mice]. *Voprosy onkologii* [Issues in Oncology]. 2020;66(4):353–363. (In Russian)]. DOI: 10.37469/0507-3758-2020-66-4-353-363.
5. Полина Ю.В., Наумова Л.И., Шишкина Т.А., Родзавевская Е.Б. Морфофункциональные изменения в надпочечниках крыс в условиях экспериментальной модели иммобилизационного стресса. *Forcipe*. 2020;3(S2):32–35. [Polina Yu.V., Naumova L.I., Shishkina T.A., Rodzaevskaya E.B. Morfofunkcional'nye izmeneniya v nadpocheknikakh kryis v usloviyakh eksperimental'noj modeli immobilizatsionnogo stressa [Morpho functional changes in the adrenal glands of rats under the conditions of an

- experimental model of immobilization stress]. *Forcipe*. 2020;3(S2):32–35. (In Russian)].
6. Almeida H., Ferreira J., Neves D. Macrophages of the adrenal cortex: a morphological study of the effects of aging and dexamethasone administration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004;1019:135–140. DOI: 10.1196/annals.1297.024.
7. Berthon A., Sahut-Barnola I., Lambert-Langlais S., de Joussineau C., Damon-Soubeyrand C., Louiset E., Taketo M.M., Tissier F., Bertherat J., Lefrançois-Martinez A.M., Martinez A., Val P. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19(8):1561–1576. DOI: 10.1093/hmg/ddq029.
8. Betterle C., Morlin L. Autoimmune Addison's disease. *Endocrine Development*. 2011;20:161–172. DOI: 10.1159/000321239.
9. Duparc C., Moreau L., Dzib J.F., Boyer H.G., Tetsi Nomigni M., Boutelet I., Boulkroun S., Mukai K., Benecke A.G., Amar L., Gobet F., Meatchi T., Plouin P.F., Zennaro M.C., Louiset E., Lefebvre H. Mast cell hyperplasia is associated with aldosterone hypersecretion in a subset of aldosterone-producing adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015;100(4):E550–560. DOI: 10.1210/jc.2014-3660.
10. Fudulu D.P., Horn G., Hazell G., Lefrançois-Martinez A.M., Martinez A., Angelini G.D., Lightman S.L., Spiga F. Co-culture of monocytes and zona fasciculata adrenal cells: An in vitro model to study the immune-adrenal cross-talk. *Mol. Cell Endocrinol.* 2021;526:111–195. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111195.
11. Hayashi Y., Hiyoshi T., Takemura T., Kurashima C., Hirokawa K. Focal lymphocytic infiltration in the adrenal cortex of the elderly: immunohistochemical analysis of infiltrating lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology*. 1989;77(1):101–105.
12. Hellesen A., Bratland E., Husebye E.S. Autoimmune addison's disease — an update on pathogenesis. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2018;79:157–163. DOI: 10.1016/j.ando.2018.03.008.
13. Ishii T., Mitsui T., Suzuki S., Matsuzaki Y., Hasegawa T. A genome-wide expression profile of adrenocortical cells in knockout mice lacking steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology*. 2012;153(6):2714–2723. DOI: 10.1210/en.2011-1627.
14. Kanczkowski W., Sue M., Bornstein S.R. Adrenal gland microenvironment and its involvement in the regulation of stress-induced hormone secretion during sepsis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2016;7:156. DOI: 10.3389/fendo.2016.00156.
15. Kanczkowski W., Sue M., Bornstein S.R. The adrenal gland microenvironment in health, disease and during regeneration. *Hormones (Athens)*. 2017;16(3):251–265. DOI: 10.14310/horm.2002.1744.
16. Kaneko J., Harvey J., Bruss M. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th ed. Academic Press, 2008:928.
17. Kemp C.J. Animal models of chemical carcinogenesis: driving breakthroughs in cancer research for 100 years. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2015;2015(10):865–874.
18. Kitawaki Y., Nakamura Y., Kubota-Nakayama F., Yamazaki Y., Miki Y., Hata S., Ise K., Kikuchi K., Morimoto R., Satoh F., Sasano H. Tumor microenvironment in functional adrenocortical adenomas: immune cell infiltration in cortisol-producing adrenocortical adenoma. *Hum. Pathol.* 2018;77:88–97. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.03.016.
19. Krywaczuk A., Bundock E.A. Fatal rotavirus infection in a 4-year-old with unsuspected autoimmune adrenal insufficiency. *Acad. Forensic Pathol.* 2017;7:130–135. DOI: 10.23907/2017.015.
20. Lerario A.M., Finco I., LaPensee C., Hammer G.D. Molecular mechanisms of stem/progenitor cell maintenance in the adrenal cortex. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2017;8:52. DOI: 10.3389/fendo.2017.00052.
21. Lopez A.G., Duparc C., Wils J., Naccache A., Castanet M., Lefebvre H., Louiset E. Steroidogenic cell microenvironment and adrenal function in physiological and pathophysiological conditions. *Mol. Cell Endocrinol.* 2021;535:111377. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111377.
22. Marx C., Bornstein S.R., Woltersdörfer G.W. Cellular immune-endocrine interaction in adrenocortical tissues. *Eur. J. Clin. Invest.* 2000;30(Suppl. 3):1–5.
23. Naccache A., Louiset E., Duparc C., Laquerrière A., Patrier S., Renouf S., Gomez-Sanchez C.E., Mukai K., Lefebvre H., Castanet M. Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016;434:69–80. DOI: 10.1016/j.mce.2016.06.015.
24. Paegeaey A.-C., Lheure C., Ratour C., Lethielleux G., Clerc J., Bertherat J., Kramkimel N., Groussin L. Polyendocrinopathy resulting from pembrolizumab in a patient with a malignant melanoma. *J. Endocr. Soc.* 2017;1(6):646–649. DOI: 10.1210/js.2017-00170.
25. Pignatti E., Leng S., Carloni D.L., Breault D.T. Regulation of zonation and homeostasis in the adrenal cortex. *Mol. Cell Endocrinol.* 2017;441:146–155. DOI: 10.1016/j.mce.2016.09.003.
26. Qian B.-Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39–51. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.014.
27. Redente E.F., Orlicky D.J., Bouchard R.J., Malkinson A.M. Tumor signaling to the bone marrow changes the phenotype of monocytes and pulmonary macrophages during urethane-induced primary lung tumorigenesis in A/J mice. *Am. J. Pathol.* 2007;170(2):693–708. DOI: 10.2353/ajpath.2007.060566.
28. Roberts E., Dobromylskyj M.J. Histopathological evaluation of the adrenal glands in a cat with primary hypoadrenocorticism and multiple endocrine disease. *JFMS Open Rep.* 2022;8(2):20551169221125207. DOI: 10.1177/20551169221125207.
29. Rose N., Mackay I. *Autoimmune diseases*. 5th ed. Academic Press. 2014:1304.
30. Theoharides T.C., Twahir A., Kempuraj D. Mast cells in the autonomic nervous system and potential role in disorders with dysautonomia and neuroinflammation. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2023;9:1081-1206(23)01397-2. DOI: 10.1016/j.anai.2023.10.032.

31. Trainer H., Hulse P., Higham C.E., Trainer P., Lorigan P. Hyponatraemia secondary to nivolumab-induced primary adrenal failure. *Endocrinol. Diabetes Metab. Case Rep.* 2016;2016:16-0108. DOI: 10.1530/EDM-16-0108.
32. Tyczewska M., Sujka-Kordowska P., Szyszka M., Jopek K., Blatkiewicz M., Malendowicz L.K., Rucinski M. Transcriptome profile of the rat adrenal gland: parenchymal and interstitial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(11):9159. DOI: 10.3390/ijms24119159.
33. Vudattu N.K., Waldron-Lynch F., Truman L.A., Deng S., Preston-Hurlburt P., Torres R., Raycroft M.T., Mamula M.J., Herold K.C. Humanized mice as a model for aberrant responses in human T cell immunotherapy. *J. Immunol.* 2014;193(2):587–596. DOI: 10.4049/jimmunol.1302455.
34. Wolkersdörfer G.W., Lohmann T., Marx C., Schröder S., Pfeiffer R., Stahl H.D., Scherbaum W.A., Chrousos G.P., Bornstein S.R. Lymphocytes stimulate dehydroepiandrosterone production through direct cellular contact with adrenal zona reticularis cells: a novel mechanism of immune-endocrine interaction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84(11):4220–4227.
35. Zinserling V.A., Semenova N.Y., Markov A.G., Rybalchenko O.V., Wang J., Rodionov R.N., Bornstein S.R. Inflammatory Cell Infiltration of Adrenals in COVID-19. *Horm. Metab. Res.* 2020;52(9):639–641. DOI: 10.1055/a-1191-8094.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Тимофеева Наталья Юрьевна*, ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»;
e-mail: bla11blabla@yandex.ru

Natalia Yu. Timofeeva*, I.N. Ulyanov Chuvash State University;
e-mail: bla11blabla@yandex.ru

Стручко Глеб Юрьевич, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»;
e-mail: glebstr@mail.ru

Gleb Yu. Struchko, Dr. Sci. (Med.), Prof., I.N. Ulyanov Chuvash State University;
e-mail: glebstr@mail.ru

Меркулова Лариса Михайловна, д.м.н., проф., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»;
e-mail: merkulova192@mail.ru

Larisa M. Merkulova, Dr. Sci. (Med.), Prof., I.N. Ulyanov Chuvash State University;
e-mail: merkulova192@mail.ru

Кострова Ольга Юрьевна, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»;
e-mail: evkbiz@yandex.ru

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

Стоменская Ирина Станиславовна, к.м.н., доц., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»;
e-mail: irina.stomenskaja@gmail.com

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

Москвичев Евгений Васильевич, д.м.н., ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»;
e-mail: moskvichev@rambler.ru

Evgenij V. Moskvichev, Dr. Sci. (Med.), I.N. Ulyanov Chuvash State University;
e-mail: moskvichev@rambler.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

XXI межрегиональная научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование» 21–22 мая 2025 года

Организатор: ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

Секция
«Методы и технологии в биомедицине»
(п. Светлые горы, Московская область)



Секция «Доклинические исследования
в биомедицине»
(п. Светлые горы, Московская область)



Секция
«Аграрные аспекты биомедицины»
(п. Светлые горы, Московская область)



Секция «Трансгеноз и критерии
качества животных»
(п. Светлые горы, Московская область)



Секция
«Биомедицинские основы фармакологии»
(г. Симферополь)



Секция «Современные проблемы
фармакотоксикологии»
(г. Санкт-Петербург)

