

УДК 616.379-008.64

DOI: 10.24884/1682-6655-2020-19-4-61-69

А. Н. ИВАНОВ, О. Н. АНТИПОВА, А. А. САВКИНА,
Т. С. КИРИЯЗИ, Т. В. СТЕПАНОВА, Д. Д. ЛАГУТИНА,
Н. А. КУЗНЕЦОВА

Влияние лираглутида на микроциркуляцию у крыс с экспериментальным сахарным диабетом, сопровождающимся абсолютной недостаточностью инсулина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Саратов, Россия

410012, Россия, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

E-mail: lex558452@rambler.ru

Статья поступила в редакцию 12.03.20; принята к печати 03.07.20

Резюме

Введение. Значительный научный и практический интерес представляет исследование ангиотропных эффектов лираглутида, успешное применение которого было показано для коррекции гликемии у пациентов с сахарным диабетом II типа, но практически не изучено при I типе данной патологии. **Цель исследования** – изучение влияния агониста рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 – лираглутида – на микроциркуляцию в условиях аллоксановой инсулиновой недостаточности у белых крыс. **Материалы и методы.** Исследования проводили на 40 белых беспородных крысах, разделенных на контрольную (n=20), сравнительную (10 крыс с диабетом, индуцированным аллоксаном в дозировке 100 мг/кг) и опытную (10 животных с аллоксановым диабетом, которым вводился лираглутид) группы. Лираглутид животным опытной группы вводили подкожно в дозировке 0,4 мг/кг ежедневно с 21-х суток после инъекции аллоксана до 42-го дня эксперимента. На 42-е сутки эксперимента у животных сравнительной и опытной групп проводилась оценка концентрации глюкозы и гликированного гемоглобина в крови, а также мониторинг микроциркуляции кожи тыльной поверхности стопы методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). **Результаты.** Нарушения углеводного обмена, индуцируемые аллоксаном, у крыс вызывают выраженные изменения микроциркуляции кожи тыльной поверхности стопы, ассоциированные со снижением эндотелийзависимой вазодилатации и повышением нейрогенного тонуса. Введение лираглутида крысам с аллоксановым диабетом нормализует показатели углеводного обмена и статистически значимо ($p < 0,00001$) повышает перфузию кожи тыльной поверхности стопы до 12,9 (12,4; 13,4) перфузионных единиц относительно группы сравнения, у животных которой значения перфузионного показателя составляли 9,6 (9,1; 10,1). Повышение перфузии микроциркуляторного русла стопы под влиянием лираглутида реализуется преимущественно за счет стимуляции эндотелийзависимой вазодилатации. **Заключение.** Применение лираглутида в дозировке 0,4 мг/кг ежедневно в течение 21 суток у крыс с аллоксановым диабетом приводит к нормализации углеводного обмена и восстановлению нормальной перфузии кожи тыльной поверхности стопы.

Ключевые слова: микроциркуляция, аллоксановый диабет, лираглутид

Для цитирования: Иванов А. Н., Антипова О. Н., Савкина А. А., Кириязи Т. С., Степанова Т. В., Лагутина Д. Д., Кузнецова Н. А. Влияние лираглутида на микроциркуляцию у крыс с экспериментальным сахарным диабетом, сопровождающимся абсолютной недостаточностью инсулина. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2020;19(4):61–69. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-4-61-69.

UDC 616.379-008.64

DOI: 10.24884/1682-6655-2020-19-4-61-69

A. N. IVANOV, O. N. ANTIPOVA, A. A. SAVKINA,
T. S. KIRIYAZI, T. V. STEPANOVA, D. D. LAGUTINA,
N. A. KUZNETSOVA

Effect of liraglutide on microcirculation in rats with experimental diabetes mellitus associated with absolute insulin deficiency

Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russia

112, olshaya Kazachya str., Saratov, Russia, 410012

E-mail: lex558452@rambler.ru

Received 12.03.20; accepted 03.07.20

Summary

Introduction. Liraglutide therapy has been shown successful in improving glycemic control in patients with type 2 diabetes, but the prospects of this drug use in treating patients with type 1 diabetes mellitus remain unclear. Therefore, the studies of

liraglutide angiotropic effects have considerable scientific and practical interest. *The aim* of present study was to investigate the effect of glucagon-like peptide-1 receptors agonist – liraglutide – on microcirculation in conditions of alloxan-induced insulin deficiency in white rats. *Materials and methods.* The study was carried out in 40 white nonlinear rats that were divided into control (n=20), comparative (10 rats with alloxan-induced diabetes at a dose of 100 mg/kg) and experimental (10 animals with alloxan-induced diabetes that were treated with liraglutide) groups. Liraglutide at a dose of 0.4 mg/kg/day was injected subcutaneously in animals of the experimental group from Day 21 till Day 42 of the experiment. On Day 42 of the experiment, the concentrations of glucose and glycated hemoglobin in the blood in animals of the comparison and the experimental group were evaluated, as well as the microcirculation of dorsal skin of posterior paw was monitored with Laser Doppler Flowmetry (LDF). *Results.* Disorders of carbohydrate metabolism induced by alloxan in rats entailed pronounced changes in the microcirculation of posterior paw dorsal skin, associated with a decrease in endothelium-dependent vasodilation and increased neurogenic tone. Treatment with liraglutide caused normalization of glycemic metabolism and significantly ($p < 0,00001$) increase perfusion of posterior paw dorsal skin in rats with alloxan-induced diabetes to 12,9 (12,4; 13,4) perfusion units regarding to 9,6 (9,1; 10,1) in animals of the comparison group. Restoration of posterior paw skin microvascular perfusion under the influence of liraglutide was realized by stimulation of endothelium-dependent vasodilation. *Conclusions.* The administration of liraglutide in a dose of 0.4 mg/kg/day for 21 days in rats with alloxan diabetes leads to normalization of carbohydrate metabolism and restoration of normal perfusion of posterior paw dorsal skin.

Keywords: microcirculation, alloxan-induced diabetes, liraglutide

For citation: Ivanov A. N., Antipova O. N., Savkina A. A., Kiriya T. S., Stepanova T. V., Lagutina D. D., Kuznetsova N. A. Effect of liraglutide on microcirculation in rats with experimental diabetes mellitus associated with absolute insulin deficiency. *Regional hemodynamics and microcirculation.* 2020; 19(4): 61–69. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-4-61-69.

Введение

Сахарный диабет на сегодняшний день является одной из наиболее значимых проблем общественного здравоохранения во всем мире. В последние десятилетия увеличение распространенности данного заболевания наблюдалось практически во всех странах, и в настоящее время насчитывается около 415 млн человек, больных сахарным диабетом [1]. Ускоренный рост заболеваемости сахарным диабетом приобретает характер неинфекционной эпидемии, сопровождающейся развитием значительного процента осложнений [2, 3]. Самой распространенной причиной инвалидности и смертности при сахарном диабете являются сосудистые осложнения, развитие которых, как правило, начинается с поражений микрососудов [4]. Это обусловлено высокой значимостью микроциркуляторного русла в обеспечении интегративного физиологического механизма, связанного с реализацией транскапиллярного обмена [5]. Микроангиопатии вызывают трофические нарушения, с вовлечением в патологический процесс более крупных сосудов, а также нервных стволов, что, в свою очередь, нарушает сосудистую иннервацию и ведет к прогрессированию осложнений [6, 7]. В связи с этим проблема ранней диагностики, профилактики и лечения сосудистых осложнений сахарного диабета является одной из наиболее актуальных задач, требующих интеграции работ профильных специалистов-эндокринологов совместно с врачами и научными сотрудниками разнообразных сфер медицины.

В последнее время высокая эффективность коррекции гликемического профиля при лечении сахарного диабета II типа доказана для агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида-1, в частности, лираглутида [8–10]. Вопрос о его применении при диабете I типа на сегодняшний день находится на стадии изучения. По данным некоторых авторов [11, 12] лираглутид при сахарном диабете I типа обладает такими положительными эффектами, как снижение уровня гликированного гемоглобина, концентрации глюкозы, массы тела, а также потребности больных в инсулине.

Учитывая лидирующие позиции сосудистых осложнений в структуре инвалидности и смертности пациентов с сахарным диабетом, ключевую роль поражения микроциркуляторного русла в качестве начального этапа развития диабетических ангиопатий, а также перспективы применения лираглутида для совершенствования терапевтической коррекции гликемии, значительный научный и практический интерес представляет исследование ангиотропных эффектов данного препарата. Однако сведений, касающихся влияния терапии агонистами глюкагоноподобного пептида на показатели микроциркуляции при нарушениях углеводного обмена, вызванных абсолютной недостаточностью инсулина, в современной доступной литературе не обнаружено, что и определило направление настоящего исследования.

Целью работы являлось изучение влияния агониста рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 – лираглутида – на микроциркуляцию в условиях аллоксановой инсулиновой недостаточности у белых крыс.

Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на 40 белых крысах массой 250–320 г, распределенных случайным способом на три группы. В состав контрольной группы были включены 20 интактных крыс, в группу сравнения – 10 животных с аллоксановым диабетом, а опытная группа состояла из 10 крыс, которым с 21-х суток аллоксанового диабета выполняли введение глюкагоноподобного пептида-1 (лираглутида). На протяжении всего исследования животные находились в стандартных условиях вивария. Для общей анестезии животным внутримышечно вводили Телазол (*Zoetis Inc*, Испания) в дозе 0,1 мл/кг и «Ксиланит» (ООО «Нита-Фарм», Россия) в дозе 1 мг/кг. Все эксперименты проводили в соответствии с рекомендациями Этического комитета СГМУ (протокол № 1 от 05 февраля 2019 г.).

Для создания экспериментального диабета использовали аллоксан. Перед его введением животные подвергались суточному голоданию. Крысам сравнительной и опытной групп подкожно вводили

5 %-й раствор аллоксана, растворенного в 0,9 %-м растворе NaCl в дозировке 100 мг/кг веса [13]. Выраженность и стойкость нарушения углеводного обмена после введения аллоксана устанавливали по концентрации в капиллярной крови глюкозы натощак и уровню гликированного гемоглобина у крыс группы сравнения.

Лираглутид – препарат Саксенда (*Novo Nordisk*, Дания) – опытным животным вводили подкожно в дозировке 0,4 мг/кг ежедневно с 21-х суток после инъекции аллоксана до 42-го дня эксперимента. Крысам группы сравнения вводили подкожно 0,9 %-й NaCl в эквивалентном объеме.

Для исследования микроциркуляции применяли методику лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), реализация которой выполнялась с помощью «ЛАКК-ОП» (Россия). ЛДФ у животных сравнительной и опытной групп выполняли на 42-е сутки эксперимента, располагая датчик анализатора на коже тыльной поверхности стопы. При выполнении работы оценивали перфузионный показатель и нормированные амплитуды колебаний перфузии в основных регуляторных частотных диапазонах, включая эндотелиальный, нейрогенный, миогенный, дыхательный и кардиальный [14]. Расчет амплитуд колебаний перфузии в указанных диапазонах реализован посредством вейвлет-анализа, нормированные значения определяли как соотношение абсолютной величины амплитуды осцилляций к утроенному среднеквадратическому отклонению перфузии.

За 12 ч до выведения из эксперимента животные подвергались голоданию без ограничения доступа к воде. На 42-е сутки после регистрации ЛДФ-грамм производили забор крови. Капиллярную кровь брали из подушечки пальцев дистальной конечности и определяли концентрацию глюкозы с помощью тест-полосок и глюкометра AccuChekPerforma. Забор цельной крови производили с помощью пункции сердца в вакуумные пробирки с КЗЭДТА. Содержание гликозилированного гемоглобина (HbA1c) определяли автоматическим биохимическим анализатором Sapphire 400 (Япония) с использованием реактивов фирмы *DiaSys* (Германия).

Статистическую обработку данных проводили средствами пакета программ «Statistica 10». Большинство полученных при выполнении настоящей работы данных не имели нормального распределения, поэтому представлены в таблицах в виде медианы и интерквартильного размаха. Сравнение между группами проведено с помощью критерия Манна – Уитни. Критический уровень значений показателя достоверности принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе выполнения работы установлено, что у крыс сравнительной группы на 42-е сутки эксперимента происходило статистически значимое, по сравнению с группой контроля, увеличение уровня глюкозы в капиллярной крови в среднем на 183 %, достигая значений 15 (12,8; 16,5) ммоль/л. В этой же группе животных HbA1c статистически достоверно повышался на 77,8 %, 9,6 (7,7; 11,3) (табл. 1).

Таким образом, на 42-е сутки у крыс группы сравнения отмечались выраженные нарушения углеводного обмена, проявляющиеся гипергликемией, а повышенный уровень HbA1c характеризовал стойкий характер развившейся гипергликемии.

Полученные с помощью ЛДФ данные свидетельствуют, что у крыс группы сравнения на 42-е сутки после введения аллоксана происходило статистически значимое по сравнению с группой контроля снижение показателя перфузии, свидетельствующее об уменьшении кровотока в микроциркуляторном русле кожи тыльной поверхности стопы. Снижение перфузии у животных группы сравнения сопровождалось угнетением активных механизмов регуляции микрокровотока. Так, у животных с аллоксановым диабетом выявлено статистически значимое относительно группы контроля уменьшение нормированных амплитуд эндотелиальных колебаний, демонстрирующее повышение эндотелийзависимого компонента тонуса артериол. Уменьшение вклада эндотелиальных колебаний в общую модуляцию микрокровотока у животных группы сравнения отражает снижение базальной секреции основного вазодилатора оксида азота. Кроме того, при вейвлет-анализе переменной составляющей перфузии у животных данной группы обнаружено уменьшение нормированных амплитуд нейрогенных колебаний, свидетельствующее о повышении нейрогенного тонуса и росте периферического сопротивления прекапиллярного звена микроциркуляторного русла. Статистически значимых изменений значения амплитуды миогенных колебаний кровотока не происходило, что, вероятно, характеризует состояние компенсации параметров нутритивного кровотока. Изменения параметров пассивных механизмов модуляции перфузии – нормированных амплитуд дыхательных и сердечных колебаний кровотока – у крыс при аллоксановом диабете статистической значимости не имели (табл. 2).

Таким образом, введение аллоксана у животных к 42-м суткам эксперимента вызывает нарушения микрокровотока кожи тыльной поверхности стопы, которые проявляются снижением перфузии и ассоциированы с угнетением эндотелийзависимой вазодилатации и повышением нейрогенного тонуса сосудов прекапиллярного звена микроциркуляции.

Обнаружено, что при введении лираглутида крысам с аллоксановым диабетом с 21-х суток эксперимента концентрация глюкозы в капиллярной крови животных опытной группы снижалась относительно группы сравнения, достигая предела вариабельности группы контроля. Кроме того, уровень HbA1c на 42-е сутки эксперимента у данной группы животных также снижался относительно значений крыс группы сравнения и имел тенденцию, не достигающую статистической значимости, к снижению относительно уровня интактных животных (табл. 1).

Таким образом, введение лираглутида в течение 21 дня экспериментальным животным с аллоксановым диабетом вызывало нормализацию параметров углеводного обмена, включая концентрацию глюкозы и содержание HbA1c в крови.

У крыс с аллоксановым диабетом при курсовом введении лираглутида отмечался более интенсивный

Таблица 1

Показатели углеводного обмена при введении лираглутида животным с аллоксановым диабетом

Table 1

The glycemic status in animals with alloxan-induced diabetes after liraglutide administration

Показатель	Группа		
	контроль (n=20)	сравнения – аллоксановый диабет (n=10)	опытная – аллоксановый диабет + лираглутид (n=10)
Гликированный гемоглобин (HbA1c), %	5,4 (5,4; 5,5)	9,6 (7,7; 11,3); $p_1=0,000036$	4,5 (4,1; 5,2); $p_1=0,053903$; $p_2=0,000036$
Глюкоза, ммоль/л	5,3 (4,9; 5,7)	15,0 (12,8; 16,5) $p_1=0,000012$	5,0 (4,8; 6,5); $p_1=0,850107$; $p_2=0,000012$

Примечание: здесь и далее p_1 – относительно контроля; p_2 – относительно группы сравнения.

относительно группы сравнения кровотоков в микроциркуляторном русле кожи тыльной поверхности стопы. У крыс с аллоксановым диабетом, получавших лираглутид, показатель перфузии повышался в среднем на 34 % относительно группы сравнения и статистически значимо не отличался от контрольных значений интактных животных. У животных с экспериментальным диабетом, которым вводился лираглутид, вклад эндотелиальных колебаний в общую модуляцию кровотока не отличался от такового у интактных крыс группы контроля. Медиана величины нормированных амплитуд нейрогенных колебаний у животных, которым вводился лираглутид, не превышала аналогичное значение у крыс группы сравнения, что свидетельствует в пользу отсутствия влияния фармакологической коррекции на нарушения нейрогенного тонуса у животных с аллоксановым диабетом. При этом нормированные величины амплитуд нейрогенных колебаний характеризовались высокой степенью вариабельности, что не позволило констатировать статистическую значимость различий относительно как группы сравнения, так и группы контроля. Кроме того, у животных опытной группы отмечалась тенденция к снижению нормированных амплитуд миогенных колебаний, что может являться признаком редукции нутритивного кровотока. Учитывая то, что данные изменения не являются статистически значимыми, вероятно, они носят компенсаторный характер, обуславливая реакцию метартериол на повышение эндотелийзависимой вазодилатации. Параметры пассивной модуляции перфузии, включая нормированные амплитуды дыхательных и сердечных колебаний, у животных опытной группы значимых изменений относительно группы сравнения не претерпевали.

Таким образом, введение лираглутида крысам с аллоксановым диабетом оказывает нормализующее влияние на нарушенную микроциркуляцию кожи тыльной поверхности стопы, что характеризуется повышением перфузионного показателя и эндотелийзависимой вазодилатации.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что введение аллоксана в дозировке 100 мг/кг вызывает выраженные нарушения

углеводного обмена, которые проявляются в увеличении уровня глюкозы в сыворотке крови экспериментальных животных, взятой натощак. Диабетогенный диапазон аллоксана для крыс составляет от 100 до 200 мг/кг, по данным одних авторов [15–18], и от 40 до 200 мг/кг, согласно другим экспериментальным исследованиям [19, 20]. По данным Р. Э. Джафаровой (2013) [21], при введении аллоксана в титруемой дозировке 150–100 мг/кг уровень глюкозы повышается до 151,5 % от контрольных значений. По данным исследований других авторов [17, 22], уровень глюкозы у крыс зависит от их чувствительности к аллоксану и может увеличиваться в 1,3–4 раза. При выполнении работы установлено, что у животных при введении аллоксана нарушения углеводного обмена стойкие, что проявляется в повышении уровня HbA1c, который отражает уровень глюкозы в крови у человека за 3 месяца, а у крыс с учетом средней продолжительности жизни эритроцитов – за 1–1,5 месяца. Это согласуется с данными [20], которые свидетельствуют, что развитие гипергликемии у крыс при введении аллоксана сохраняется до трех месяцев эксперимента. По данным литературы, диабетогенный эффект аллоксана, в основном, объясняется стимуляцией образования свободных радикалов в бета-клетках, которые имеют относительно слабые антиоксидантные защитные механизмы. Окислительный стресс, индуцируемый аллоксаном, в конечном итоге, вызывает фрагментацию ДНК β -клеток, что в дальнейшем приводит к их гибели [16, 17, 21]. Другие механизмы повреждения бета-клеток аллоксаном включают в себя окисление основных групп глюкокиназы и нарушения внутриклеточного гомеостаза кальция [19]. Кроме этого, результатом сложной цепи биохимических событий является опосредованное снижением продукции АТФ и подавление глюкозоиндуцированной секреции инсулина [16, 20]. Гибель β -клеток поджелудочной железы и снижение их чувствительности к глюкозе вызывает абсолютную недостаточность инсулина у животных, что приводит к развитию нарушений углеводного обмена, которые аналогичны таковым у пациентов с сахарным диабетом I типа [19]. Метаболические нарушения в организме животных при введении аллоксана также характеризуются

Таблица 2

Изменения параметров микроциркуляции кожи тыльной поверхности стопы при введении лираглутида животным с аллоксановым диабетом

Table 2

Changes of the microcirculation of dorsal skin of posterior paw in animals with alloxan-induced diabetes after liraglutide administration

Показатель	Группа		
	контроль (n=20)	сравнения – аллоксановый диабет (n=10)	опытная – аллоксановый диабет + лираглутид (n=10)
Показатель перфузии, пф. ед.	12,7 (12,0; 13,0)	9,6 (9,1; 10,1); p ₁ =0,000120	12,9 (12,4; 13,4); p ₁ =0,216436; p ₂ =0,000000
Эндотелиальные колебания, усл. ед.	17,7 (14,0; 20,0)	9,5 (8,5; 10,9); p ₁ =0,001931	18,3 (12,8; 23,5); p ₁ =0,582758; p ₂ =0,000067
Нейрогенные колебания, усл. ед.	11,2 (10,3; 14,3)	10,0 (7,7; 11,3); p ₁ =0,042626	9,7 (7,2; 12,3); p ₁ =0,074193; p ₂ =0,785351
Миогенные колебания, усл. ед.	10,3 (9,9; 10,5)	10,3 (8,0; 12,2); p ₁ =0,905072	9,2 (5,8; 11,5); p ₁ =0,302986; p ₂ =0,265206
Дыхательные колебания, усл. ед.	8,8 (7,7; 11,5)	6,7 (4,5; 9,0); p ₁ =0,152407	6,7 (4,8; 8,7); p ₁ =0,068797; p ₂ =0,804449
Сердечные колебания, усл. ед.	6,6 (5,5; 9,3)	5,8 (3,9; 6,9); p ₁ =0,371094	5,3 (3,5; 6,1); p ₁ =0,079932; p ₂ =0,254733

повышением концентрации продуктов окислительной модификации белков и повышением окислительного потенциала организма [22].

Введение аллоксана экспериментальным животным сопровождалось нарушениями микрокровотока кожи тыльной поверхности стопы, которые проявлялись снижением перфузии и были ассоциированы с угнетением эндотелийзависимой вазодилатации и повышением нейрогенного тонуса сосудов прекапиллярного звена микроциркуляции. Важно отметить, что ЛДФ-мониторинг у пациентов с сахарным диабетом отражает возникновение микроциркуляторных нарушений еще до развития клинических проявлений ангиопатий [23]. Следовательно, выявленные сдвиги микроциркуляторных параметров у экспериментальных животных следует расценивать как наиболее ранние проявления поражения сосудистого русла при нарушениях углеводного обмена.

Выявленное угнетение эндотелийзависимой вазодилатации у крыс с аллоксановым диабетом, проявляющееся уменьшением колебаний в эндотелиальном диапазоне спектра ЛДФ-грамм, которое отражает снижение продукции и/или биодоступности основного вазодилатора – оксида азота (NO), что характеризует дисфункцию эндотелиальных клеток [24]. В основе нарушения продукции NO под влиянием гипергликемии лежит несколько сигнальных механизмов, включая активацию протеинкиназы C, НАДФ-оксигеназы, развитие дисфункции митохондрий, приводящих к гиперпродукции активных форм кислорода (АФК). АФК, в свою очередь, вызывают

снижение биодоступности оксида азота (NO) различными реакциями, включая преобразование NO в пероксинитрит, обладающий выраженным окислительным эффектом, окисление кофактора эндотелиальной NO-синтазы тетрагидробиоптерина (BH₄), активацию транскрипционного фактора NFκB, запускающего продукцию провоспалительных цитокинов [25, 26]. BH₄ обеспечивает димеризацию эндотелиальной NO-синтазы, а его дефицит способствует переходу фермента в мономерную форму и продукции вместо NO супероксиданиона, что еще больше увеличивает оксидативный стресс эндотелиоцитов. То есть взаимодействие между активными формами кислорода и NO создает порочный круг, приводящий к прогрессирующему повреждению эндотелия [27]. Кроме того, АФК являются стимуляторами продукции эндотелиальных вазоконстрикторов, включая эндотелин I, тромбосан A2, ангиотензин II, и других веществ [25, 28], которые могут обуславливать обнаруженную редукцию кровотока в микроциркуляторном русле у крыс с аллоксановым диабетом.

Обнаруженное в ходе эксперимента повышение нейрогенного тонуса, проявляющееся снижением нормированных амплитуд колебаний перфузии в соответствующем регуляторном диапазоне, у крыс группы сравнения может быть обусловлено, с одной стороны, повышением чувствительности гладкомышечных клеток к вазоконстрикторным сигналам симпатической нервной системы, а с другой – увеличением концентрации циркулирующих катхоламинов [24]. Повышение чувствительности гладкомышечных

клеток к сигналам симпатической нервной системы ассоциировано с гиперэкспрессией $\alpha 1$ -адренергических рецепторов. Так, недавние исследования [29] свидетельствуют, что у мышей с аллоксановым диабетом наблюдается повышение экспрессии данного типа рецепторов на мембране гладкомышечных клетках сосудов кожи, что сопровождается выраженной ангиоспастической реакцией на катехоламины. Кроме того, было продемонстрировано, что клетки мезангия почечных клубочков, выделенные от гипергликемических животных, демонстрируют повышенную продукцию катехоламинов [30, 31].

Уровень глюкозы в крови у животных на ранних стадиях развития аллоксанового диабета значительно варьирует, и, согласно данным литературы [21], стабилизация гипергликемии происходит в период от 10-х до 21-х суток после введения препарата. В этой связи при выполнении настоящей работы коррекцию гликемии лираглутидом у крыс с диабетом начинали с 21-х суток после введения аллоксана, т. е. на фоне сформировавшихся нарушений углеводного обмена. При выполнении исследования установлено, что введение лираглутида в течение 21 дня экспериментальным животным с аллоксановым диабетом вызывало нормализацию параметров углеводного обмена, включая концентрацию глюкозы и содержание HbA1c в крови. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, в частности, K. Tamura et al. (2015) [32] продемонстрировали, что инъекции лираглутида предотвращали повышение уровня глюкозы в крови и повышали уровень инсулина у мышей с аллоксановым диабетом; улучшали толерантность к глюкозе путем восстановления секреторной функции инсулина β -клеток островков Лангерганса. Кроме того, авторы [32] показали возможность восстановления островкового аппарата поджелудочной железы под влиянием лираглутида, что проявлялось увеличением скорости пролиферации и уменьшения апоптоза β -клеток за счет подавления в них свободнорадикального окисления. Эффекты лираглутида на массу и функцию β -клеток являлись устойчивыми после отмены препарата.

Представленные данные свидетельствуют, что введение лираглутида крысам с аллоксановым диабетом оказывает нормализующее влияние на нарушенную микроциркуляцию кожи тыльной поверхности стопы, что характеризуется повышением перфузионного показателя и восстановлением адекватных параметров эндотелийзависимой вазодилатации. Выявленные эффекты лираглутида могут быть связаны с нормализацией углеводного обмена, что предотвращает дальнейшую альтерацию эндотелиальных клеток либо с прямым эндотелийпротекторным действием данного препарата. Следует отметить, что на модели артериальной гипертензии у мышей аналоги глюкагоноподобного пептида снижают артериальное давление и оказывают эндотелийпротекторное действие независимо от уровня гликемии [33]. Эти данные предполагают, что оба механизма влияния лираглутида на микроциркуляцию у крыс с аллоксановым диабетом могут реализовываться независимо и дополнять друг друга.

Учитывая, что повышение перфузии кожи тыльной поверхности стопы у крыс с аллоксановым диабетом осуществлялось в основном за счет стимуляции эндотелийзависимой дилатации, особый интерес представляют механизмы действия лираглутида на систему NO. В условиях *in vitro* продемонстрировано, что обработка эндотелиальных клеток человека лираглутидом снижала экспрессию адгезивных молекул и ингибитора активатора плазминогена посредством активации рецептора GLP-1R [34]. В условиях эксперимента на недиабетической модели артериальной гипертензии на животных было показано, что активация GLP-1R лираглутидом снижает воспаление в сосудистой стенке, окислительный стресс эндотелиоцитов, препятствует мономеризации эндотелиальной NO-синтазы и повышает биодоступность оксида азота [33]. Результаты клинических исследований ангиопротекторного действия лираглутида в настоящее время продемонстрированы только у пациентов со II типом сахарного диабета и не являются однозначными. Так, было показано [35] улучшение эндотелийзависимой вазодилатации у пациентов с сахарным диабетом 2 типа под влиянием лираглутида. Данные других авторов [36] свидетельствуют, что терапия лираглутидом не оказывает существенного влияния ни на коронарную, ни на периферическую микрососудистую функцию у пациентов с сахарным диабетом II типа. Противоречивость приведенных литературных данных обуславливает необходимость дальнейших исследований характера и механизмов ангиопротекторных эффектов лираглутида при диабете.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют, что нарушения углеводного обмена, индуцируемые аллоксаном, у крыс вызывают выраженные изменения микроциркуляции кожи тыльной поверхности стопы, ассоциированные со снижением эндотелийзависимой вазодилатации и повышением нейрогенного тонуса. Введение лираглутида крысам с аллоксановым диабетом нормализует показатели углеводного обмена и повышает перфузию кожи конечностей преимущественно за счет стимуляции эндотелийзависимой вазодилатации. Выявленные ангиопротекторные эффекты лираглутида на экспериментальной модели диабета, сопровождающегося абсолютной недостаточностью инсулина, обуславливают перспективы его апробации для лечения и профилактики сосудистых осложнений у больных с сахарным диабетом I типа, однако механизмы влияния данного препарата на сосудистое русло нуждаются в дальнейшем детальном изучении и уточнении.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Минздрава России «Разработка технологий медикаментозной и немедикаментозной коррекции микроциркуляторных нарушений при сахарном диабете, сопровождающемся абсолютной недостаточностью инсулина, в условиях эксперимента» (регистрационный номер АААА-А19-119021190053-0). / The study

was performed in the framework of the state assignment of the Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky Ministry of Health of Russia «Development of technologies for drug and non-drug correction of microcirculatory disorders in diabetes mellitus, accompanied by absolute insulin deficiency, in experimental conditions» (registration number AAAA-A19-119021190053-0).

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

- Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linenkamp U, Guariguata L, Cho NH, Cavan D, Shaw JE, Makaroff LE. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;128:40–50. Doi: 10.1016/j.diabres.2017.03.024.
- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107843. Doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
- Дедов И. И., Шестакова М. В., Викулова О. К. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клиничко-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета // Сахар. диабет. – 2017. – Т. 20, № 1. – С. 13–41. [Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK. Epidemiology of diabetes mellitus in Russian Federation: clinical and statistical report according to the federal diabetes registry. *Diabetes mellitus.* 2017;20(1):13–41. (In Russ.)]. Doi: 10.14341/DM8664.
- Strain WD, Paldanius PM. Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation. *Cardiovasc Diabetol.* 2018 Apr 18;17(1):57. Doi: 10.1186/s12933-018-0703-2.
- Dal Canto E, Ceriello A, Rydén L, Ferrini M, Hansen TB, Schnell O, Standl E, Beulens JW. Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of macro and micro vascular complications. *Eur J Prev Cardiol.* 2019;26(2):25–32. Doi: 10.1177/2047487319878371.
- Garofolo M, Gualdani E, Giannarelli R, Aragona M, Campi F, Lucchesi D, Daniele G, Miccoli R, Francesconi P, Del Prato S, Penno G. Microvascular complications burden (nephropathy, retinopathy and peripheral polyneuropathy) affects risk of major vascular events and all-cause mortality in type 1 diabetes: a 10-year follow-up study. *Cardiovasc Diabetol.* 2019;18(1):159. Doi: 10.1186/s12933-019-0961-7.
- Bjerg L, Hulman A, Carstensen B, Charles M, Witte DR, Jørgensen ME. Effect of duration and burden of microvascular complications on mortality rate in type 1 diabetes: an observational clinical cohort study. *Diabetologia.* 2019;62(4):633–643. Doi: 10.1007/s00125-019-4812-6.
- Аметов А. С., Невольникова А. О., Тертычная Е. А. Возможности агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 в снижении сердечно-сосудистого риска у пациентов с сахарным диабетом типа 2: что нового? // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2019. – Т. 8, № 3. – С. 44–53. [Ametov AS, Nevolnikova AO, Tertychnaya EA. The potential of GLP-1 receptor agonists in reducing cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes mellitus: what's new? *Endocrinology: News, Opinions, Training.* 2019;8(3):44–53. (In Russ.)]. Doi: 10.24411/2304-9529-2019-13005.
- Бабенко А. Ю., Барбараш О. Л., Гринева Е. Н. и др. Возможности снижения сердечно-сосудистых рисков у пациентов с сахарным диабетом 2 типа // Рос. кардиол. журн. – 2017. – № 9. – С. 99–103. [Babenko AY, Barbarash OL, Grinevae N, Drapkina OM, Dupljakov DV, Ezhov MV, Karpov YuA, Konradi AO, Nedogoda SV, Nedoshivin AO, Ratova LG. The possibility of reducing cardiovascular risk in patients with diabetes mellitus type 2. *Russ J Cardiol.* 2017;9(149):99–103. (In Russ.)]. Doi: 10.15829/1560-4071-2017-9-99-103.
- Zhang X, Shao F, Zhu L, Ze Y, Zhu D, Bi Y. Cardiovascular and microvascular outcomes of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled cardiovascular outcome trials with trial sequential analysis. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2018;19(1):58. Doi: 10.1186/s40360-018-0246-x.
- Mathieu C, Zinman B, Hemmingsson JU, Woo V, Colman P, Christiansen E, Linder M, Bode B. Efficacy and Safety of Liraglutide Added to Insulin Treatment in Type 1 Diabetes: The adjunct one Treat-To-Target Randomized Trial. *Diabetes Care.* 2016;39(10):1702–1710. Doi: 10.2337/dc16-0691.
- Harris KB, Boland CL. Adjunctive Role of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists in the Management of Type 1 Diabetes Mellitus. *Pharmacotherapy.* 2016;36(9):1011–1020. Doi: 10.1002/phar.1804.
- Гати Моханнад Абдулраззак Гати, Федорин Д. Н., Полякова-Семенова Н. Д. и др. Физиолого-биохимические аспекты адаптации крыс к условиям аллоксанового диабета // Фундам. исслед. – 2013. – № 11–3. – С. 465–469. [Gati Mohannad Abdulrazzak Gati, Fedorin DN, Polyakova-Semenova ND, Vashanov GA, Eprintsev AT. Physiological and biochemical aspects of adaptation rats to conditions alloxan diabetes. *Fundamental research.* 2013;11–3:465–469. (In Russ.)].
- Humeau A, Koïtka A, Abraham P, Saumet JL, L'Huilier JP. Time-frequency analysis of laser Doppler flowmetry signals recorded in response to a progressive pressure applied locally on anaesthetized healthy rats. *Physics in Medicine and Biology.* 2004;49(5):843–857. Doi: 10.1088/0031-9155/49/5/014.
- Federiuk IF, Casey HM, Quinn MJ, Wood MD, Ward WK. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp Med.* 2004;54(3):252–257.
- Экспериментальные модели сахарного диабета 1-го типа / М. И. Ярмолинская, Н. Ю. Андреева, Е. И. Абашиова, Е. В. Мишарина // Журн. акушерства и жен. болезней. – 2019. – Т. 68, № 2. – С. 109–118. [Yarmolinskaya MI, Andreyeva NYu, Abashova EI, Misharina EV. Experimental models of type 1 diabetes. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases.* 2019;68(2):109–118. (In Russ.)]. Doi: 10.17816/JOWD682109-118.
- Гормонально-биохимические особенности аллоксановой и стрептозотоциновой моделей экспериментального диабета / Н. А. Пальчикова, Н. В. Кузнецова, О. И. Кузьмина, В. Г. Селяницкая // Бюл. Сиб. отд-ния Рос. Акад. мед. наук. – 2013. – Т. 33, № 6. – С. 18–24. [Palchikova NA, Kuznetsova NV, Kuzminova OI, Selyatitskaya VG. Hormonal and biochemical features of alloxan and streptozotocin-induced models of experimental diabetes. *Scientific Centre of Clinical and Experimental Medicine of SB RAMS.* 2013;33(6):18–24. (In Russ.)].
- Abdullah KM, Abul Qais F, Hasan H, Naseem I. Anti-diabetic study of vitamin B6 on hyperglycaemia induced protein carbonylation, DNA damage and ROS production in alloxan induced diabetic rats. *Toxicol Res (Camb).* 2019;8(4):568–579. Doi: 10.1039/c9tx00089e.

19. Aileen JF King. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. 2012;166(3):877–894. Doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x.
20. Можейко Л. А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета. Часть I. Аллоксановый диабет // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2013. – № 3. – С. 26–29. [Mozheyko LA. Experimental models for studying diabetes mellitus. Part I. Alloxan diabetes. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2013;3:26–29. (In Russ.)].
21. Джафарова Р. Э. Сравнительное исследование различных моделей аллоксан-индуцированного сахарного диабета // Казан. мед. журн. – 2013. – Т. 94, № 6. – С. 915–919. [Jafarova RE. A comparative study of various models of alloxan-induced diabetes mellitus. *Kazan Medical Journal*. 2013;94(6):915–919. (In Russ.)].
22. Яшанова М. И., Щербатюк Т. Г., Николаев В. Ю. Валидность моделей экспериментального диабета для изучения окислительного стресса // Журн. мед.-биол. исслед. – 2019. – Т. 7, № 1. – С. 66–78. [Yashanova MI, Shcherbatyuk TG, Nikolaev VYu. Validity of the Models of Experimental Diabetes for Oxidative Stress Studies. *Journal of Medical and Biological Research*. 2019;7(1):66–78. (In Russ.)]. Doi: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.1.66.
23. Шинкин М. В., Звенигородская Л. А., Мкртумян А. М. Лазерная доплеровская флоуметрия и флуоресцентная спектроскопия как методы оценки доклинических проявлений синдрома диабетической стопы // Эффективная фармакотерапия. Эндокринология. – 2018. – № 2. – С. 6–12. [Shinkin MV, Zvenigorodskaya LA, Mkrtumyan AM. Laser Doppler Flowmetry and Fluorescence Spectroscopy as Methods for Preclinical Manifestations of Diabetic Foot Syndrome Assessment. *Effective pharmacotherapy. Endocrinology*. 2018;(2):6–12. (In Russ.)].
24. Крупаткин А. И., Сидоров В. В. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови: рук. для врачей. – М.: Медицина, 2005. – 256 с. [Krupatkin AI, Sidorov VV. *Lazernaja dopplerovskaja floumetrija mikrocirkuljacii krovi: rukovodstvo dlja vrachej*. Moscow, Medicina, 2005:256. (In Russ.)].
25. Bagi Z. Too much TRAFfic at the crossroads of diabetes and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018 Jan 1;314(1):H65–H67. Doi: 10.1152/ajpheart.00614.2017.
26. Мельникова Ю. С., Макарова Т. П. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических болезней // Каз. мед. журн. – 2015. – Т. 96, № 4. – С. 659–665. [Mel'nikova YS, Makarova TP. Endothelial dysfunction as the key link of chronic diseases pathogenesis. *Kazan medical journal*. 2015;96(4):659–665. (In Russ.)]. Doi: 10.17750/KMJ2015-659.
27. Carrizzo A, Izzo C, Olivetti M, Alfano A, Virtuoso N, Capunzo M, Di Pietro P, Calabrese M, De Simone E, Sciarretta S, Frati G, Migliorino S, Damato A, Ambrosio M, Francesco De Caro F, Vecchione C. The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation. *Int. J. Mol. Sci*. 2018;19(10):2968. Doi: 10.3390/ijms19102968.
28. Показатели эндотелиальной дисфункции у больных с синдромом диабетической стопы // П. А. Герасимчук, П. В. Кисиль, В. Г. Власенко, А. В. Павлышин // Вестн. РАМН. – 2014. – № 5–6. – С. 107–110. [Gerasymchuk PA, Kisil PV, Vlasenko VG, Pavlyshyn AV. Endothelial dysfunction indicators in patients with diabetic foot syndrome. *Vestnik Rossijskoi Akademii Meditsinskikh Nauk – Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2014;5–6:107–110. (In Russ.)].
29. Feng W, Shi R, Zhang C, Liu S, Yu T, Zhu D. Visualization of skin microvascular dysfunction of type 1 diabetic mice using in vivo skin optical clearing method. *J Biomed Opt*. 2018;24(3):1–9. Doi: 10.1117/1.JBO.24.3.031003.
30. Marco GS, Colucci JA, Fernandes FB, Vio CP, Schor N, Casarini DE. Diabetes induces changes of catecholamines in primary mesangial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(4):747–54. Doi: 10.1016/j.biocel.2007.10.016
31. Watson AMD, Gould EAM, Penfold SA, Lambert GW, Pratama PR, Dai A, Gray SP, Head GA, Jandeleit-Dahm. Diabetes and Hypertension Differentially Affect Renal Catecholamines and Renal Reactive Oxygen Species. *Front Physiol*. 2019;10:309. Doi: 10.3389/fphys.2019.00309.
32. Tamura K, Minami K, Kudo M, Iemoto K, Takahashi H, Seino S. Liraglutide improves pancreatic Beta cell mass and function in alloxan-induced diabetic mice. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126003. Doi: 10.1371/journal.pone.0126003.
33. Helmstädter J, Frenis K, Filippou K, Grill A, Dib M, Kalinovic S, Pawelke F, Kus K, Kröller-Schön S, Oelze M. Endothelial GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) Receptor Mediates Cardiovascular Protection by Liraglutide In Mice With Experimental Arterial Hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2020;40(1):145–158. Doi: 10.1161/atv.0000615456.97862.30.
34. Gaspari T, Liu H, Welungoda I, Hu Y, Widdop RE, Knudsen LB, Simpson RW, Dear AE. A GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelial cell dysfunction and vascular adhesion molecule expression in an ApoE-/- mouse model. *Diab Vasc Dis Res*. 2011;8(2):117–124. Doi: 10.1177/1479164111404257.
35. Симаненкова А. В., Макарова М. Н., Бутото М. И. и др. Эндотелиопротективный эффект лираглутида у больных сахарным диабетом 2-го типа // Артер. гипертензия. – 2018. – Т. 24, № 1. – С. 81–92. [Simanenkova AV, Makarova MN, Butomo MI, Vlasov TD, Shlyakhto EV. Endothelial protective effect of liraglutide in type 2 diabetes mellitus. *Arterial Hypertension*. 2018;24(1):81–92. (In Russ.)]. Doi: 10.18705/1607-419X-2018-24-1-81-92.
36. Faber R, Zander M, Pena A, Michelsen MM, Mygind ND, Prescott E. Effect of the glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide on coronary microvascular function in patients with type 2 diabetes – a randomized, single-blinded, cross-over pilot study. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:41. Doi: 10.1186/s12933-015-0206-3.

Информация об авторах

Иванов Алексей Николаевич – д-р мед. наук, зав. отделением лабораторной диагностики, главный научный сотрудник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований Научно-исследовательского института травматологии, ортопедии и нейрохирургии, зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией, Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского, г. Саратов, Россия, e-mail: lex558452@rambler.ru.

Антипова Ольга Николаевна – д-р мед. наук, профессор кафедры нормальной физиологии им. И. А. Чувевского, ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского, г. Саратов, Россия, e-mail: oantipova911@yandex.ru.

Савкина Ангелина Альбертовна – младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского, г. Саратов, Россия, e-mail: sawkina.ange@yandex.ru.

Кириязи Татьяна Святославовна – канд. биол. наук, зав. кафедрой медико-биологических дисциплин, Саратовский медицинский университет РЕАВИЗ, г. Саратов, Россия, e-mail: fev.6171@yandex.ru.

Степанова Татьяна Вячеславовна – младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборато-

рии, Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского, г. Саратов, Россия, e-mail: cnil-sgmu@mail.ru

Лагутина Дарья Дмитриевна – лаборант-исследователь Центральной научно-исследовательской лаборатории, Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского, г. Саратов, Россия, e-mail: darya.lagutina@yandex.ru.

Кузнецова Наталья Анатольевна – младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского, г. Саратов, Россия, e-mail: cnil-sgmu@mail.ru.

Authors information

Ivanov Alexey N. – Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Laboratory Diagnostics, General Researcher of the Department of Fundamental and Clinical Experimental Research of Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery, Head of the Central Scientific Research Laboratory, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russia, e-mail: lex558452@rambler.ru

Antipova Olga N. – Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Normal Physiology named after I.A. Chuevsky,

Leading Researcher of the Central Scientific Research Laboratory, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russia, e-mail: oantipova911@yandex.ru.

Savkina Angelina A. – Research Assistant of the Central Research Laboratory, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russia, e-mail: sawkina.ange@yandex.ru.

Kiriyazi Tat'yana S. – Candidate of Biological Sciences, Head of the Department of Biomedical Disciplines, Saratov Medical University REAVIZ, Saratov, Russia, e-mail: fev.6171@yandex.ru.

Stepanova Tat'yana V. – Research Assistant of the Central Research Laboratory, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russia, e-mail: cnil-sgmu@mail.ru.

Лагутина Дарья D. – Laboratory Assistant of the Central Research Laboratory, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russia, e-mail: darya.lagutina@yandex.ru.

Kuznetsova Natalya A. – Research Assistant of the Central Research Laboratory, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russia, e-mail: cnil-sgmu@mail.ru.