



ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА И КОЛИЧЕСТВА ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК НА МОДЕЛЯХ ОПУХОЛЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЕТАСТАЗАМИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО *IN VIVO*

Е. В. Заикина¹✉, И. А. Аллилуев¹, Ю. Н. Лазутин¹, Ю. В. Пржедецкий¹, Ю. С. Шатова¹, М. А. Енгибарян¹, Е. Ф. Комарова^{1,2}, Д. А. Харагезов¹, А. В. Галина¹, А. А. Киблицкая¹, М. В. Миндарь¹, Л. З. Курбанова¹

1. НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

2. РостГМУ, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

✉ katherine_bio@mail.ru

Резюме

Цель исследования. Оценка антиоксидантного статуса и степени повреждения ДНК в тканях подкожных ксенографтов немелкоклеточного рака легкого и перитуморальной зоны, созданных с использованием клеточных линий A549 и H1299.

Материалы и методы. Исследование проводили на 35 интактных иммунодефицитных самцах мышей линии Balb/c Nude. В качестве трансплантируемого опухолевого биоматериала использовались клеточные линии A549 и H1299. Процедуру создания CDX-модели проводили в соответствии с протоколом для супратенториальных инъекций (Ozawa T., James C. D., 2010), адаптированным для данного эксперимента. Контроль темпов роста и визуализацию интракраниальных ксенографтов проводили с помощью системы для микро-КТ в высоком разрешении. Определение активности каталазы и супероксиддисмутазы проводили с помощью электрофореза в неденатурирующих условиях в 8 % и 12 % полиакриламидном геле. Концентрацию сульфгидрильных групп определяли по Элману. Уровень повреждения ДНК в лимфоцитах определяли методом ДНК-комет.

Результаты. В результате эксперимента были получены модели опухолевого поражения головного мозга, в 100 % характеризующиеся интракраниальным характером роста. Установлено, что активность каталазы в исследуемых лизатах интракраниальных ксенографтов, ткани перитуморальной зоны и условно здоровой ткани животных–опухоленосителей во всех опытных группах статистически значимо увеличивалась относительно условно-здоровой ткани интактных животных, причем наибольшие отличия от контроля были зарегистрированы в группе животных, которым имплантировали культуру H1299 в концентрации 1×10^6 . Активность супероксиддисмутазы в исследуемых лизатах интракраниальных ксенографтов и ткани перитуморальной зоны статистически значимо увеличивалась относительно контрольного образца во всех опытных группах. Наиболее выраженное увеличение активности СОД наблюдалось в ткани интракраниальных ксенографтов с наибольшей опухолевой нагрузкой, что составило 28,8 % и 32,9 % изменений относительно контрольного образца. Выявлено статистически значимое увеличение концентрации SH-групп относительно контрольного образца в лизатах опухолевой ткани во всех экспериментальных группах, причем наибольшая концентрация наблюдалась в группе экспериментальных животных с наибольшей опухолевой нагрузкой составила $36,2 \pm 0,47$. Установлено, что % изменений показателя «tail moment» (показатель степени повреждения ДНК) в группах О1, О2, О3 и О4 статистически значимо увеличивался относительно контрольного образца на 55,8 %, 111,8 %, 97,3 % и 170 %, соответственно.

Заключение. Наблюдаемое повышение активности системы антиоксидантной защиты, накопление окислительных модификаций белков, а также увеличение двунитевых разрывов ДНК в тканях интракраниальных ксенографтов немелкоклеточного рака легкого *in vivo* позволяет говорить о том, что созданные модели отражают процессы, сходные с таковыми в опухолях немелкоклеточного рака легкого человека.

Ключевые слова:

окислительный стресс, антиоксидантные ферменты, ксенографты, CDX-модели

Для корреспонденции:

Заикина Екатерина Владиславовна – младший научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация.

Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63

E-mail: katherine_bio@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-2990>, SPIN: 4000-4369, AuthorID: 1045258, Scopus Author ID: 57221463270

Финансирование: финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования:

Заикина Е. В., Аллилуев И. А., Лазутин Ю. Н., Пржедецкий Ю. В., Шатова Ю. С., Енгибарян М. А., Комарова Е. Ф., Харагезов Д. А., Галина А. В., Киблицкая А. А., Миндарь М. В., Курбанова Л. З. Исследование антиоксидантного статуса и количества двунитевых разрывов ДНК на моделях опухолевого поражения головного мозга метастазами немелкоклеточного рака легкого *in vivo*. Исследования и практика в медицине. 2022; 9(4): 30–41. <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2022-9-4-3>

Статья поступила в редакцию 03.03.2022; одобрена после рецензирования 10.11.2022; принята к публикации 23.12.2022.

© Заикина Е. В., Аллилуев И. А., Лазутин Ю. Н., Пржедецкий Ю. В., Шатова Ю. С., Енгибарян М. А., Комарова Е. Ф., Харагезов Д. А., Галина А. В., Киблицкая А. А., Миндарь М. В., Курбанова Л. З., 2022

INVESTIGATION OF THE ANTIOXIDANT STATUS AND THE NUMBER OF DOUBLE-STRANDED DNA BREAKS IN MODELS OF BRAIN TUMOR LESION BY METASTASES OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER *IN VIVO*

E. V. Zaikina^{1✉}, I. A. Alliluev¹, Yu. N. Lazutin¹, Yu. V. Przhedetskiy¹, Yu. S. Shatova¹, M. A. Engibaryan¹, E. F. Komarova^{1,2}, D. A. Kharagezov¹, A. V. Galina¹, A. A. Kiblitckaya¹, M. V. Mindar¹, L. Z. Kurbanova¹

1. National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

2. Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

✉ katherine_bio@mail.ru

Abstract

Purpose of the study. Evaluation of the antioxidant status and DNA damage in tissues of subcutaneous xenografts of non-small cell lung cancer and in peritumoral tissues created using the A549 and H1299 cell cultures.

Materials and methods. The study included 35 intact male Balb/c Nude immunodeficient mice. Cell lines A549 and H1299 were used as transplantable tumor biomaterial. A CDX model was created in accordance with the protocol for supratentorial injections (Ozawa T., James C. D., 2010) adapted for this experiment. Growth rates were controlled and intracranial xenografts were visualized using a high-resolution micro-CT system. The activity of catalase and superoxide dismutase was determined with non-denaturing electrophoresis in 8 % and 12 % polyacrylamide gel. The concentrations of sulfhydryl groups were determined according to Ellman. The DNA damage in lymphocytes was determined by the comet assay.

Results. The experiment resulted in the creation of models of brain tumors characterized by intracranial growth pattern in 100 %. The activity of catalase in the studied lysates of intracranial xenografts, peritumoral tissue and healthy tissues of tumor-bearing animals in all experimental groups increased statistically significantly relative to the healthy tissue of intact animals, and the greatest differences from the control were recorded in the group of animals with implanted H1299 culture at a concentration of 1×10^6 . Superoxide dismutase activity in the studied lysates of intracranial xenografts and peritumoral tissues statistically significantly increased compared to the control sample in all experimental groups. The highest increase in the SOD activity was observed in the tissues of intracranial xenografts with the highest tumor load, which amounted to 28.8 % and 32.9 % of the changes relative to the control sample. A statistically significant increase in the concentration of SH-groups relative to the control sample in tumor tissue lysates was revealed in all experimental groups, and the highest concentration (36.2 ± 0.47) was observed in the group of experimental animals with the highest tumor load. Percentage change in tail moment (DNA damage indicator) in groups O1, O2, O3 and O4 increased statistically significantly compared to the control sample by 55.8 %, 111.8 %, 97.3 % and 170 %, respectively.

Conclusions. The observed increase in the activity of the antioxidant defense system, accumulation of oxidative modifications of proteins, and an increase in DNA double-strand breaks in the tissues of intracranial xenografts of non-small cell lung cancer *in vivo* suggest that the created models reflect processes similar to those in tumors of human non-small cell lung cancer.

Keywords:

oxidative stress, antioxidant enzymes, xenografts, CDX models

For correspondence:

Ekaterina V. Zaikina – junior researcher, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Address: 63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

E-mail: katherine_bio@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-2990>

SPIN: 4000-4369, AuthorID: 1045258

Scopus Author ID: 57221463270

Funding: this work was not funded.

Conflict of interest: authors report no conflict of interest.

For citation:

Zaikina E. V., Alliluev I. A., Lazutin Yu. N., Przhedetskiy Yu. V., Shatova Yu. S., Engibaryan M. A., Komarova E. F., Kharagezov D. A., Galina A. V., Kiblitckaya A. A., Mindar M. V., Kurbanova L. Z. Investigation of the antioxidant status and the number of double-stranded DNA breaks in models of brain tumor lesion by metastases of non-small cell lung cancer *in vivo*. Research and Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.). 2022; 9(4):30-41. (In Russ.).

<https://doi.org/10.17709/2410-1893-2022-9-4-3>

The article was submitted 03.03.2022; approved after reviewing 10.11.2022; accepted for publication 23.12.2022.

ВВЕДЕНИЕ

Онкогенез представляет собой многоэтапный процесс, сопровождающийся состоянием окислительного стресса (ОС) – дисбаланса между продукцией свободных радикалов (СР) и активностью антиоксидантной системы (АОС) [1]. СР являются короткоживущими высоко реакционноспособными химическими соединениями, которые содержат один или несколько электронов с неспаренным спином и могут приводить к окислительным модификациям биомолекул. Главными СР являются активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота (АФА) [2]. Принимая электрон соседней молекулы, АФК приводит к образованию радикала из потерявшей электрон молекулы [3].

К эффектам АФК относят окислительные повреждения белков, липидов, одно- и двунитевые разрывы ДНК, точечные мутации (8-оксогуанин, урацил, АП-сайты). АФК увеличивают скорость возникновения мутаций в протоонкогенах и генах-супрессорах опухолей, которые становятся причиной неопластической трансформации. Кроме того, сигнальные пути, активированные СР, способствуют клеточной пролиферации, ангиогенезу и метастазированию. На примере АФА-опосредованного окислительного стресса было показано, что СР способствуют клеточной трансформации путем активации фактора транскрипции AP-1 [4]. Таким образом, ОС можно рассматривать в качестве индуктора онкогенеза.

Антиоксидантный статус в тканях опухолей различной локализации является глубоко изученным фактором патогенеза злокачественного процесса [5–6]. Однако данных о состоянии АОС, ОС и ассоциированных с ним повреждений ДНК и белков в ткани ксенографтов в отечественной и зарубежной литературе не представлено.

Цель исследования: исследование антиоксидантного статуса и степени повреждения ДНК в тканях подкожных ксенографтов немелкоклеточного рака легкого и перитуморальной зоны, созданных с использованием клеточных линий A549 и H1299.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Исследование проводили на 35 интактных иммунодефицитных самцах мышей линии Balb/c Nude с массой тела 18–24 г, возрастом 5–6 недель, из которых 7 составляли контрольную группу (далее КГ). Животные содержались в SPF-виварии в системе искусственно вентилируемых клеток с соблюдением светового режима день/ночь (12/12 часов) при температуре 22–26 °С и относительной влажности воздуха 50–60 %.

Работа с животными осуществлялась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» Хельсинской декларации. План исследования был одобрен биоэтической комиссией Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Трансплантируемый опухолевый материал

В качестве трансплантируемого опухолевого биоматериала использовались клеточные линии A549 и H1299, полученные в коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде RPMI1640 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % FBS (Gibco, США) и 100 мкг/мл стрептомицина в CO₂ инкубаторе при 37 °С и 5 % CO₂.

Наркотизация животных

Наркотизацию мышей осуществляли по запатентованному ранее протоколу (патент на изобретение RU № 2712916, опубл. 05.02.2020 г., Бюл. № 4), предполагающему проведение премедикации с помощью внутримышечного введения 1,5 мл/кг препарата Ксила (Interchemie werken «De Adelaar» B.V, Нидерланды) концентрацией 20 мг/мл. Через 15 минут после премедикации проводили внутримышечную инъекцию водного раствора препарата «Золетил 50» (Virbac, Франция) концентрацией 22,57 мг/мл. Об адекватности глубины наркоза судили по отсутствию «педального» рефлекса.

Таблица 1. Распределение экспериментальных животных по группам

Table 1. Distribution of experimental animals by groups

Наименование группы / Group name	Код группы / Group code	Количество и пол животных / Number and sex of animals	Клеточная линия / Cell line	Концентрация клеток / Cellular concentration
Опытная № 1 / Study No. 1	O1	7 ♂	A549	5 × 10 ⁵
Опытная № 2 / Study No. 2	O2	7 ♂	A549	1 × 10 ⁶
Опытная № 3 / Study No. 3	O3	7 ♂	H1299	5 × 10 ⁵
Опытная № 4 / Study No. 4	O4	7 ♂	H1299	1 × 10 ⁶

Создание CDX-модели

Процедуру создания CDX-модели, проведенную в соответствии с протоколом для супратенториальных инъекций, адаптированным для данного эксперимента, проводили согласно таблице 1 [7].

Суспензии клеток, концентрацией 5×10^5 и 1×10^6 , набирали в шприц Гамильтона, зафиксированный в манипуляторе, после чего имплантировали 5 мкл суспензии. Края раны соединяли простым узловым швом, используя шовный материал пролен 4-0.

Визуализация роста интракраниальных ксенографтов

Контроль темпов роста и визуализацию интракраниальных ксенографтов проводили с помощью системы для микро-КТ в высоком разрешении Quantum GX2 (Perkin Elmer, США). Сканирование осуществляли в течение 2 минут при напряжении 90 кВ, силе тока 88 мА и регуляторе вокселя составлял 72. Сканирование проводили на 15, 30 и 60 сутки после процедуры интракраниальной имплантации. Для ингаляционной наркотизации животного использовали изофлюран. Обработку полученных изображений осуществляли с помощью программного обеспечения RadiAnt DICOM Viewer 4.6.9 Setup (Medixant).

Процедура эвтаназии, забора крови и выделения ксенографтов

Процедура эвтаназии животных, предполагала проведение декапитации с последующим забором крови в пробирки с антикоагулянтом на 60 сутки после процедуры интракраниальной имплантации. Посмертно проводили диссекцию головного мозга с последующим выделением опухолевой ткани и перитуморальной зоны.

Лизис клеточной суспензии и выделение белков

Выделенные фрагменты опухолевой ткани и пе-

ритуморальной зоны животных—опухоленосителей, а также условно здоровой ткани мозга контрольных животных гомогенизировали в 50 мМ Трис-НСl буфере (pH 8.0) в присутствии ингибиторов протеиназ при помощи ультразвукового гомогенизатора Ultrasonic Processor VCX-130. Хранение образцов осуществлялось при -20°C .

Определение активности каталазы

Определение активности каталазы проводили с помощью электрофореза в неденатурирующих условиях в 8 % полиакриламидном геле (ПААГ) по Weydert и Cullen (Weydert, Cullen, 2009). Пробы лизатов, содержащие 100 мкг белка, вносили в лунки геля, предварительно разведя в соотношении 1:1 с буфером, содержащим 0,5М Трис pH 6.8, глицерол и 200 мкл 5 % бромфенолового синего. Преэлектрофорез проводили в течение 1 часа при 40 мА и 4°C в буфере, содержащем 6,06 г Трис, 22,5 г глицина в 1 л деионизованной воды. Электрофорез проводили в течение 3 ч при 10 мА и 4°C в том же буфере. Для инициации реакции, катализируемой каталазой, готовили 0,003 % раствор H_2O_2 , в котором инкубировали гели в течение 10 минут. Для окраски гелей использовали 2 % раствор хлорида железа (III) и 2 % раствор феррицианида калия. При проявлении ахроматических полос процесс окрашивания останавливали, помещая гели в деионизованную воду. Сканирование гелей осуществлялось при помощи ChemiDoc MP System («Bio-Rad», США).

Определение активности супероксиддисмутазы

Определение активности супероксиддисмутазы проводили с помощью электрофореза в неденатурирующих условиях в 12 % ПААГ по Weydert и Cullen (Weydert, Cullen, 2009). Пробы лизатов, содержащие

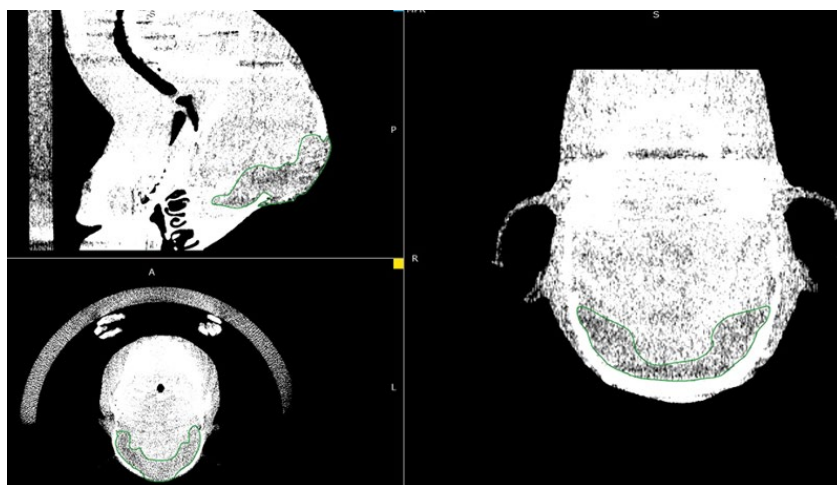


Рис. 1. КТ изображение интракраниального ксенографта.

Fig. 1. CT image of the intracranial xenograft.

250 мкг белка, разводили в соотношении 1:1 с буфером, содержащим 0,5М Трис pH 6,8, глицерол и 200 мкл 5 % бромфенолового синего. Процедуры преэлектрофореза и электрофореза проводили в тех же режимах. Окрашивание проводили при комнатной температуре, помещая гель в краситель, содержащий

700 мкл 0,1 % адреналина в 20 мл Na_2CO_3 -буфера. После проявления прозрачных полос на фиолетовом геле инкубацию останавливали, трижды промывая гель в деионизованной воде в течение 10 минут. Интенсивность ахроматических полос оценивали с помощью Image Lab 6.0.1 («Bio-Rad», США).

Таблица 2. Активность каталазы в исследуемых лизатах
Table 2. Catalase activity in the studied lysates

Группа / Group	M ± m	t	p	Δ %
Опухолевая ткань / Tumor tissue				
O1	97,3 ± 0,67	262,08	0,0001	319,0
O2	126,3 ± 2,19	123,32	0,0003	443,9
O3	107 ± 1,15	184,15	0,0001	360,7
O4	132,7 ± 1,67	170,23	0,0001	471,2
Перитуморальная зона / Peritumoral zone				
O1	56,7 ± 1,45	59,29	0,0011	144,0
O2	64,0 ± 2,52	42,48	0,003	175,5
O3	56,0 ± 1,53	55,41	0,0014	141,1
O4	76,3 ± 1,45	94,17	0,0004	228,6
Условно здоровая ткань / Relatively healthy tissue				
O1	31,1 ± 1,59	12,48	0,033	34,0
O2	38,6 ± 0,25	95,99	0,001	66,1
O3	43,2 ± 0,97	51,41	0,0008	85,8
O4	44,1 ± 1,28	41,65	0,002	89,8

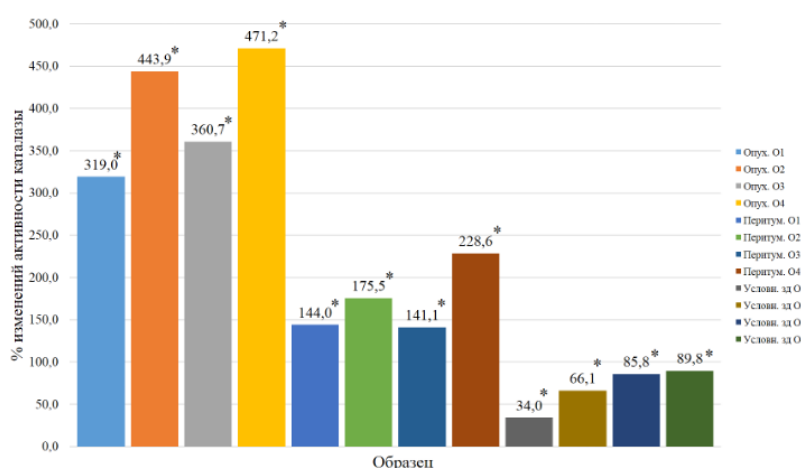


Рис. 2. Процент изменений активности каталазы в образцах интракраниальных ксенографтов, ткани перитуморальной зоны и условно здоровой ткани животных-опухоленосителей относительно контрольного образца; * – достоверные отличия ($p < 0,05$).
Примечание: контрольный образец считали равным нулю.

Fig. 2. Percentage of changes in catalase activity in samples of intracranial xenografts, tissue of the peritumoral zone and conditionally healthy tissue of tumor-bearing animals relative to the control sample; * – significant differences ($p < 0.05$).
Note: the control sample was considered equal to zero.

**Определение концентрации
сульфгидрильных групп**

Для определения концентрации сульфгидрильных групп использовали реактив Элмана (Thermo Scientific, США). Стандартные растворы готовили, растворяя L-цистеин гидрохлорид в реакционном буфере, содержа-

щем 0,1 М фосфат кальция и 1 мМ ЭДТА, pH 8.0. Оптическую плотность измеряли при длине волны 412 нм на спектрофотометре Beckman Coulter DU-800 (США).

Метод ДНК-комет

Для определения повреждений ДНК методом ДНК-комет использовали лимфоциты, выделенные

Таблица 3. Активность супероксиддисмутазы в исследуемых лизатах
Table 3. Superoxide dismutase activity in the studied lysates

Группа / Group	M ± m	t	p	Δ %
Опухолевая ткань / Tumor tissue				
O1	550,93 ± 0,82	98,68	0,0001	18,8
O2	597,33 ± 0,59	155,92	0,0001	28,8
O3	557,90 ± 0,91	105,12	0,001	20,3
O4	616,40 ± 1,55	150,50	0,018	32,9
Перитуморальная зона / Peritumoral zone				
O1	477,13 ± 1,57	13,02	0,010	2,9
O2	482,53 ± 0,92	20,82	0,006	4,0
O3	481,26 ± 0,82	19,71	0,008	3,8
O4	483,33 ± 1,40	19,85	0,003	4,2
Условно здоровая ткань / Relatively healthy tissue				
O1	454,20 ± 0,57	11,31	0,039	-2,1
O2	459,93 ± 0,87	5,54	0,139	-1,1
O3	464,73 ± 2,11	0,75	0,789	0,2
O4	471,77 ± 4,54	4,14	0,218	1,7

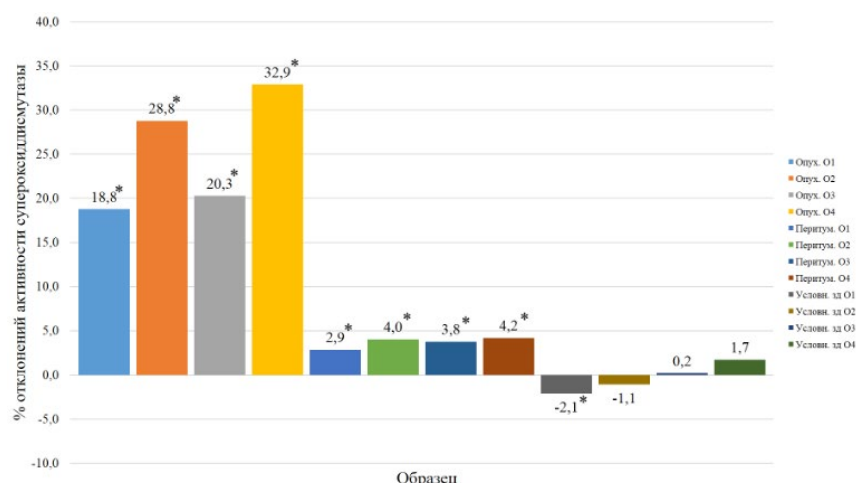


Рис. 3. Процент изменений активности супероксиддисмутазы в образцах интракраниальных ксенографтов, ткани перитуморальной зоны и условно здоровой ткани животных-опухоленосителей относительно контрольного образца; * – достоверные отличия ($p < 0,05$).
Примечание: контрольный образец считали равным нулю.

Fig. 3. Percentage of changes in superoxide dismutase activity in samples of intracranial xenografts, peritumoral zone tissue and conditionally healthy tissue of tumor-bearing animals relative to the control sample; * – significant differences ($p < 0.05$).
Note: the control sample was considered equal to zero.

в градиенте плотности фикол-верографин. Клетки смешивали с PBS в соотношении 1:1, после чего наносили 60 мкл полученной суспензии на предметные стекла, покрытые агарозой. Через 30 минут инкубации в 4 °C стекла помещали в лизирующий раствор на ночь. Процедуру электрофореза про-

водили в течении 30 минут при 25 В, 300 мА. Для окрашивания стекла инкубировали в 80 мкл бромистого этидия в течении часа. Визуализацию осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа. Полученные изображения анализировали с помощью программы Comet Score, для оценки количества

Таблица 4. Концентрация сульфгидрильных групп в исследуемых лизатах, нМ SH/мг белка
Table 4. Concentration of sulphhydryl groups in the studied lysates, nM SH/mg of protein

Группа / Group	M ± m	t	p	Δ %
Опухолевая ткань / Tumor tissue				
O1	19,5 ± 0,33	25,48	0,0006	31,4
O2	29,1 ± 0,33	77,91	0,0081	96,0
O3	26,8 ± 1,16	26,05	0,005	80,4
O4	36,2 ± 0,47	96,67	0,0064	143,8
Перитуморальная зона / Peritumoral zone				
O1	14,4 ± 0,25	2,68	0,374	-2,9
O2	15,6 ± 0,15	5,55	0,137	5,4
O3	18,4 ± 0,29	20,75	0,001	24,0
O4	20,9 ± 0,49	26,93	0,0008	41,2
Условно здоровая ткань / Relatively healthy tissue				
O1	16,0 ± 1,65	1,83	0,555	7,8
O2	13,9 ± 0,28	5,29	0,119	-6,1
O3	16,3 ± 0,67	5,11	0,148	9,8
O4	17,8 ± 0,03	22,57	0,0128	20,2

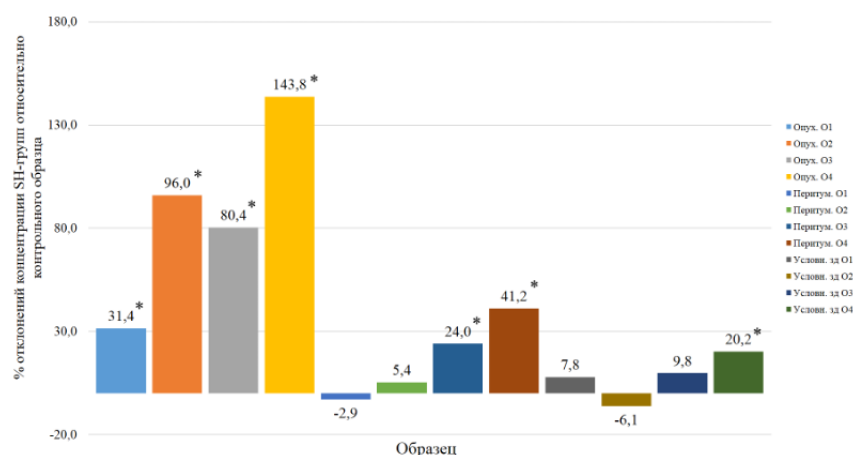


Рис. 4. Процент отклонений концентрации SH-групп в образцах интракраниальных ксенографтов, ткани перитуморальной зоны и условно здоровой ткани животных-опухоленосителей относительно контрольного образца; * – достоверные отличия ($p < 0,05$).
Примечание: контрольный образец считали равным нулю.

Fig. 4. Percentage of deviations in the concentration of SH-groups in samples of intracranial xenografts, peritumoral zone tissue and conditionally healthy tissue of tumor-bearing animals relative to the control sample; * – significant differences ($p < 0.05$).
Note: the control sample was considered equal to zero.

двуниевых разрывов использовали показатель «tail moment», равный отношению длины хвоста кометы (tail length) к содержанию ДНК в хвосте (tail DNA percent).

Статистическая обработка

В ходе исследования эксперименты выполняли в трех параллелях для каждой клеточной линии, поэтому представленные результаты отражают средние значения проведенных экспериментов. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ Statistica 10.0 (StatSoft. Inc., США) и PDQuest 2-DAdvanced 8.0.1 (Bio-Rad, США). Для оценки статистической значимости различий сравниваемых групп использовали t-критерий Стьюдента. Отклонения считали достоверными при вероятности различий сравниваемых групп более 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Путем интракраниальной имплантации клеточных линий A549 и H1299 были созданы четыре CDX-модели поражения головного мозга метастазами немелкоклеточного рака легкого. Изображение микро-КТ, полученное на 30 день после процедуры имплантации, представлено на рисунке 1.

На основании результатов микро-КТ можно говорить о наличии экзофитного роста ксенографтов у большинства животных-реципиентов. Приживляемость опухолевого материала во всех опытных группах составила 100 %.

Установлено, что активность каталазы в исследуемых лизатах интракраниальных ксенографтов, ткани перитуморальной зоны и условно здоровой ткани животных-опухоленосителей во всех опы-

ных группах статистически значимо увеличивалась относительно условно-здоровой ткани интактных животных, причем наибольшие отличия от контроля были зарегистрированы в группе животных, которым имплантировали культуру H1299 в концентрации 1×10^6 (O4) (табл. 2).

Наиболее выраженное увеличение активности каталазы относительно контрольного образца наблюдалось в опухолевой ткани животных, которым имплантировали опухолевый материал в наибольшей концентрации (в группах O2 и O4), что составило 443,9 % и 471,2 % изменений (рис. 2). В образцах перитуморальной зоны наибольший процент изменений также был зарегистрирован в группах O2 и O4, что составило 175,5 % и 228,6 %. В образцах условно здоровой ткани наиболее выраженные изменения были зарегистрированы в группах O3 и O4, что составило 85,8 % и 89,8 %, соответственно.

Было обнаружено, что активность супероксиддисмутазы в исследуемых лизатах интракраниальных ксенографтов и ткани перитуморальной зоны статистически значимо увеличивалась относительно контрольного образца во всех опытных группах. Однако, в образцах условно здоровой ткани животных-опухоленосителей группы O1 было выявлено статистически значимое уменьшение активности СОД на 2,1 % (табл. 3). В образцах лизатов условно здоровой ткани групп O2, O3 и O4 статистически значимого уменьшения активности каталазы не обнаружено.

Наиболее выраженное увеличение активности СОД наблюдалось в ткани интракраниальных ксенографтов с наибольшей опухолевой нагрузкой (в группах O2 и O4), что составило 28,8 % и 32,9 % изменений относительно контрольного образца (рис. 3).

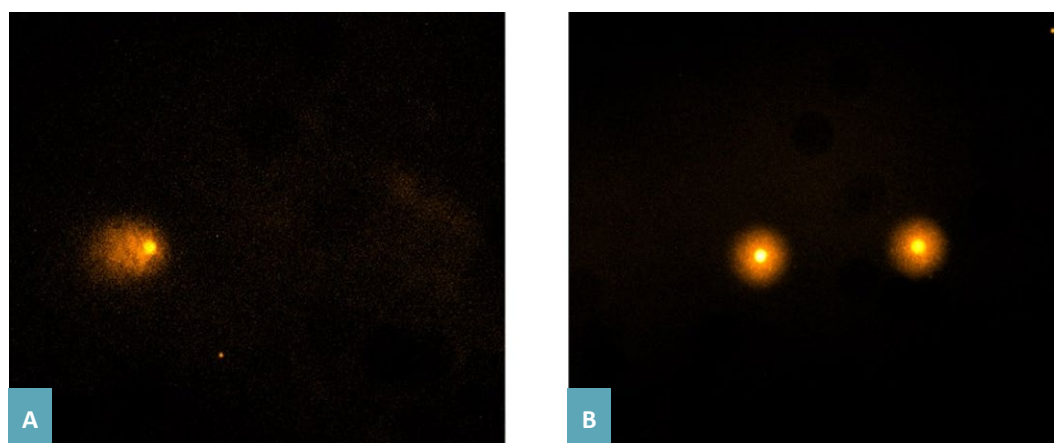


Рис. 5. Микрофотографии ДНК-комет. А – вид ДНК-кометы в лимфоцитах животных с ксенографтами A549 (5×10^5); В – вид ДНК-комет в лимфоцитах интактных животных.

Fig. 5. Micrographs of DNA comets. A – type of DNA comet in lymphocytes of animals with xenografts A549 (5×10^5); B – type of DNA comets in lymphocytes of intact animals.

Было выявлено статистически значимое увеличение концентрации SH-групп относительно контрольного образца в лизатах опухолевой ткани во всех экспериментальных группах, причем наибольшая концентрация наблюдалась в группе экспериментальных животных с наибольшей опухолевой нагрузкой (O4) и составила $36,2 \pm 0,47$. Статистически значимое увеличение концентрации в образцах перитуморальной зоны наблюдалось в группах животных, которым была имплантирована культура H1299 (O3 и O4), что составило $18,4 \pm 0,29$ и $20,9 \pm 0,49$, соответственно. В образцах условно здоровой ткани головного мозга статистически значимое увеличение концентрации SH-групп (20,2 %) было зарегистрировано в группе носителей H1299 в концентрации $1 \cdot 10^6$ (O4) (табл. 4, рис. 4).

Количество двуниевых разрывов ДНК оценивали по критерию «tail moment» на основании результатов флуоресцентной микроскопии. Примеры микрофотографий, полученных ДНК-комет представлены на рисунке 5.

Установлено, что % изменений показателя «tail moment» в группах O1, O2, O3 и O4 статистически значимо увеличивался относительно контрольного образца на 55,8 %, 111,8 %, 97,3 % и 170 %, соответственно (рис. 6).

АФК играют важную роль во многих патофизиологических процессах, в том числе в активации онкогенов, ингибировании генов-супрессоров, перекисном окислении липидов, повреждении белков, а также активации клеточной дифференцировки. Активация таких ферментов антиоксидантной системы, как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и глутатион S-трансфераза является хорошо описанным событием развития опухолей головного мозга у человека, однако зарубежных и отечественных исследований,

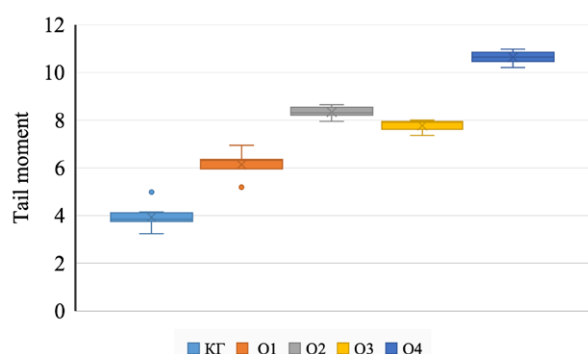


Рис. 6. Среднегрупповые значения показателя «tail moment».

Fig. 6. Average group values of the "tail moment" indicator.

зарегистрировавших повышение концентрации данных ферментов в тканях ксенографтов крайне мало [7–10].

В результате проведенного эксперимента были успешно созданы модели опухолевого поражения головного мозга метастазами немелкоклеточного рака легкого, в 100 % характеризующиеся интракраниальным характером роста. Во всех образцах опухолевой ткани индуцированных новообразований отмечалось статистически значимое увеличение активности антиоксидантных ферментов, что является подтверждением течения процессов перекисного окисления в опухолевых клетках. Кроме того, повышение активности ферментов отмечалось в некоторых образцах перитуморальной зоны и условно здоровой ткани экспериментальных животных. Также было установлено повышение концентрации сульфгидрильных групп в лизатах трех видов тканей и количества двуниевых разрывов ДНК в лимфоцитах животных-опухоленосителей. Полученные результаты согласуются с результатами других исследований, проведенных для опухолевой ткани пациентов. Так, например, в работе Погореловой Ю. А. и соав. (2011) было продемонстрировано увеличение активности антиоксидантных ферментов в образцах ткани первичных опухолей головного мозга и метастазов рака молочной железы, легкого и почки, локализованных в головном мозге [10]. Авторами было убедительно продемонстрирована ассоциация окислительных повреждений белков и нуклеиновых кислот с накоплением АФК в клетках. Кроме того, в работе Тушинской Л. А. с коллегами, была описана роль АФК в пролиферации опухолей головного мозга, что подтверждает закономерный характер повышения активности антиоксидантных ферментов в тканях первичных и метастатических опухолей головного мозга [11–14]. Наблюдаемые в настоящем исследовании изменения активности антиоксидантных ферментов могут рассматриваться в качестве клинко-экспериментальных закономерностей и могут быть использованы в качестве одного из критериев валидации моделей *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наблюдаемое повышение активности системы антиоксидантной защиты, накопление окислительных модификаций белков, а также увеличение двуниевых разрывов ДНК в тканях интракраниальных ксенографтов немелкоклеточного рака легкого *in vivo* позволяет говорить о том, что созданные модели отражают процессы, сходные с таковыми в опухолях немелкоклеточного рака легкого человека.

Список источников

1. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018 Apr 26;13:757–772. <https://doi.org/10.2147/cia.s158513>
2. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
3. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020 Aug 10;38(2):167–197. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>
4. Rezatabar S, Karimian A, Rameshknia V, Parsian H, Majidinia M, Kopi TA, et al. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *J Cell Physiol*. 2019 Feb 27. <https://doi.org/10.1002/jcp.28334>
5. Brown JL, Lawrence MM, Ahn B, Kneis P, Piekarz KM, Qaisar R, et al. Cancer cachexia in a mouse model of oxidative stress. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020 Dec;11(6):1688–1704. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12615>
6. Жукова Г. В., Шихлярова А. И., Сагакянц А. Б., Протасова Т. П. О расширении вариантов использования мышей BALB/c nude для экспериментального изучения злокачественных опухолей человека *in vivo*. Южно-Российский онкологический журнал. 2020;1(2):28–35. <https://doi.org/10.37748/2687-0533-2020-1-2-4>
7. Ozawa T, James CD. Establishing intracranial brain tumor xenografts with subsequent analysis of tumor growth and response to therapy using bioluminescence imaging. *J Vis Exp*. 2010 Jul 13;(41):1986. <https://doi.org/10.3791/1986>
8. Кит О. И., Франциянц Е. М., Никпелова Е. А., Комарова Е. Ф., Козлова Л. С., Таварян И. С. и др. Изменения маркеров пролиферации, неоангиогенеза и системы активации плазминогена в ткани рака прямой кишки. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015;(2(114)):40–45.
9. Ebrahimi S, Soltani A, Hashemy SI. Oxidative stress in cervical cancer pathogenesis and resistance to therapy. *J Cell Biochem*. 2018 Nov 13. <https://doi.org/10.1002/jcb.28007>
10. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*. 2019 Jul;25:101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
11. Li X, Hou Y, Zhao J, Li J, Wang S, Fang J. Combination of chemotherapy and oxidative stress to enhance cancer cell apoptosis. *Chem Sci*. 2020 Feb 25;11(12):3215–3222. <https://doi.org/10.1039/c9sc05997k>
12. Machado KL, Marinello PC, Silva TNX, Silva CFN, Luiz RC, Cecchini R, et al. Oxidative Stress in Caffeine Action on the Proliferation and Death of Human Breast Cancer Cells MCF-7 and MDA-MB-231. *Nutr Cancer*. 2021;73(8):1378–1388. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1795693>
13. Погорелова Ю. А., Франциянц Е. М., Балязин И. В., Комарова Е. Ф., Черярина Н. Д. Состояние свободнорадикальных процессов в ткани опухолей мозга и метастазов рака различной локализации в головной мозг. Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2011;(3(163)):112–116.
14. Тушинская Л. А., Щерина А. В., Мурач Е. И., Медяник И. А. Роль активных форм кислорода в работе сигнальных путей клеточной пролиферации и апоптоза в опухолях головного мозга. Сборник тезисов V Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием "VolgaMedScience". 2019, 522–523 с.

References

1. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018 Apr 26;13:757–772. <https://doi.org/10.2147/cia.s158513>
2. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
3. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020 Aug 10;38(2):167–197. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>
4. Rezatabar S, Karimian A, Rameshknia V, Parsian H, Majidinia M, Kopi TA, et al. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *J Cell Physiol*. 2019 Feb 27. <https://doi.org/10.1002/jcp.28334>
5. Brown JL, Lawrence MM, Ahn B, Kneis P, Piekarz KM, Qaisar R, et al. Cancer cachexia in a mouse model of oxidative stress. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020 Dec;11(6):1688–1704. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12615>
6. Zhukova GV, Shikhliarova AI, Sagakyants AB, Protasova TP. About expanding options for using BALB/c nude mice for experimental study of human malignant tumors *in vivo*. *South Russian Journal of Cancer*. 2020;1(2):28–35. <https://doi.org/10.37748/2687-0533-2020-1-2-4>
7. Ozawa T, James CD. Establishing intracranial brain tumor xenografts with subsequent analysis of tumor growth and response to therapy using bioluminescence imaging. *J Vis Exp*. 2010 Jul 13;(41):1986. <https://doi.org/10.3791/1986>
8. Kit OI, Frantsiyants EM, Nikpelova EA, Komarova EF, Kozlova LS, Tavaryan IS, et al. Changes in markers of proliferation, neoangiogenesis and plasminogen activation system in rectal cancer tissue. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2015;(2(114)):40–45.
9. Ebrahimi S, Soltani A, Hashemy SI. Oxidative stress in cervical cancer pathogenesis and resistance to therapy. *J Cell Biochem*. 2018 Nov 13. <https://doi.org/10.1002/jcb.28007>

10. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* 2019 Jul;25:101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
11. Li X, Hou Y, Zhao J, Li J, Wang S, Fang J. Combination of chemotherapy and oxidative stress to enhance cancer cell apoptosis. *Chem Sci.* 2020 Feb 25;11(12):3215–3222. <https://doi.org/10.1039/c9sc05997k>
12. Machado KL, Marinello PC, Silva TNX, Silva CFN, Luiz RC, Cecchini R, Cecchini AL. Oxidative Stress in Caffeine Action on the Proliferation and Death of Human Breast Cancer Cells MCF-7 and MDA-MB-231. *Nutr Cancer.* 2021;73(8):1378–1388. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1795693>
13. Pogorelova YuA, Frantziyantz EM, Balyazin IV, Komarova EF, Cheryarina ND. A free radical processes condition in a perifocal zone tissue of the brain tumours and cancer metastases of various localization in the brain. *Bulletin of Higher Education Institutes. North Caucasus Region. Natural Sciences.* 2011;3(163):112–116. (In Russ.).
14. Tushinskaya LA, Shchedrina AV, Murach EI, Medyanik IA. The role of reactive oxygen species in the signaling pathways of cell proliferation and apoptosis in brain tumors. *Proceedings of abstracts of the V All-Russian Conference of Young Scientists and Students with international participation "VolgaMedScience".* 2019, 522–523 p. (In Russ.).

Информация об авторах:

Заикина Екатерина Владиславовна  – младший научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-2990>, SPIN: 4000-4369, AuthorID: 1045258, Scopus Author ID: 57221463270

Аллилуев Илья Александрович – научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7654-0650>, SPIN: 3731-9788, AuthorID: 854085, ResearcherID: T-6603-2017, Scopus Author ID: 57205686207

Лазутин Юрий Николаевич – к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник торакального отделения, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6655-7632>, SPIN: 5098-7887, AuthorID: 364457

Пржедецкий Юрий Валентинович – д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, хирург-онколог высшей категории, пластический и реконструктивный хирург, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. SPIN: 3888-6265, AuthorID: 702006

Шатова Юлиана Сергеевна – д.м.н., врач-онколог отделения опухолей костей, кожи, мягких тканей и молочной железы, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1748-9186>, SPIN: 8503-3573, AuthorID: 294376

Енгибарян Марина Александровна – д.м.н., научный сотрудник, врач-онколог высшей квалификационной категории, заведующая отделением опухолей головы и шеи, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7293-2358>, SPIN: 1764-0276, AuthorID: 318503, Scopus Author ID: 57046075800

Комарова Екатерина Федоровна – профессор РАН, д.б.н., заведующий кафедрой биомедицины и психофизиологии, ФГБОУ ВО «РостГМУ» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация; ведущий научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7553-6550>, SPIN: 1094-3139, AuthorID: 348709

Харагезов Дмитрий Акимович – к.м.н., онколог, хирург, заведующий отделением торакальной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0640-2994>, SPIN: 5120-0561, AuthorID: 733789, ResearcherID: AAZ-3638-2021, Scopus Author ID: 56626499300

Галина Анастасия Владимировна – младший научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7823-3865>, SPIN: 9171-4476, AuthorID: 1071933, Scopus Author ID: 57221460594

Киблицкая Александра Андреевна – научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9337-5535>, SPIN: 2437-4102, AuthorID: 610872

Миндарь Мария Вадимовна – младший научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8734-9210>, SPIN: 5148-0830, AuthorID: 1032029, Scopus Author ID: 57217235360

Курбанова Луиза Зулкаидовна – младший научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3436-1325>, SPIN: 9060-4853, AuthorID: 1020533

Information about authors:

Ekaterina V. Zaikina  – junior researcher, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0088-2990>, SPIN: 4000-4369, AuthorID: 1045258, Scopus Author ID: 57221463270

Ilya A. Alliluev – research associate, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7654-0650>, SPIN: 3731-9788, AuthorID: 854085, ResearcherID: T-6603-2017, Scopus Author ID: 57205686207

Yuriy N. Lazutin – Cand. Sci. (Med.), associate professor, leading researcher of the thoracic department, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6655-7632>, SPIN: 5098-7887, AuthorID: 364457

Yuriy V. Przhedetskiy – Dr. Sci. (Med.), Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, oncologist of the highest category, plastic and reconstructive surgeon, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. SPIN: 3888-6265, AuthorID: 702006

Yuliana S. Shatova – Dr. Sci. (Med.), oncologist of the department of tumors of bones, skin, soft tissues and breast, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1748-9186>, SPIN: 8503-3573, AuthorID: 294376

Marina A. Engibaryan – Dr. Sci. (Med.), researcher, oncologist of the highest category, head of the department of head and neck tumors, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7293-2358>, SPIN: 1764-0276, AuthorID: 318503, Scopus Author ID: 57046075800

Ekaterina F. Komarova – professor of Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), head of the department of biomedicine and psychophysiology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation; senior research fellow, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7553-6550>, SPIN: 1094-3139, AuthorID: 348709, ResearcherID: T-4520-2019

Заикина Е. В.[✉], Аллилуев И. А., Лазутин Ю. Н., Пржедецкий Ю. В., Шатова Ю. С., Енгибарян М. А., Комарова Е. Ф., Харагезов Д. А., Галина А. В., Киблицкая А. А., Миндарь М. В., Курбанова Л. З. / Исследование антиоксидантного статуса и количества двуниевых разрывов ДНК на моделях опухолевого поражения головного мозга метастазами немелкоклеточного рака легкого *in vivo*

Dmitriy A. Kharagezov – Cand. Sci. (Med.), oncologist, surgeon, head of the department of thoracic oncology, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0640-2994>, SPIN: 5120-0561, AuthorID: 733789, ResearcherID: AAZ-3638-2021, Scopus Author ID: 56626499300

Anastasiya V. Galina – junior research fellow of the testing laboratory center, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7823-3865>, SPIN: 9171-4476, AuthorID: 1071933, Scopus Author ID: 57221460594

Alexandra A. Kiblickskaya – researcher, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9337-5535>, SPIN: 2437-4102, AuthorID: 610872

Mariya V. Mindar – junior research fellow, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8734-9210>, SPIN: 5148-0830, AuthorID: 1032029, Scopus Author ID: 57217235360

Luiza Z. Kurbanova – junior researcher, National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3436-1325>, SPIN: 9060-4853, AuthorID: 1020533

Вклад авторов:

Заикина Е. В. – проведение лабораторных исследований, написание текста;

Аллилуев И. А. – проведение лабораторных исследований;

Лазутин Ю. Н. – написание текста;

Пржедецкий Ю. В. – анализ данных;

Шатова Ю. С. – сбор и анализ данных;

Енгибарян М. А. – написание текста, техническое редактирование;

Комарова Е. Ф. – редактирование текста рукописи;

Харагезов Д. А. – оформление библиографии;

Галина А. В. – техническое редактирование;

Киблицкая А. А. – написание текста, техническое редактирование;

Миндарь М. В. – анализ данных;

Курбанова Л. З. – оформление библиографии.

Authors contribution:

Zaikina E. V. – conducting laboratory tests, manuscript writing;

Alliluev I. A. – conducting laboratory tests;

Lazutin Yu. N. – manuscript writing;

Przhehetskiy Yu. V. – data analysis;

Shatova Yu. S. – data collection and analysis;

Engibaryan M. A. – manuscript writing, technical editing;

Komarova E. F. – technical editing;

Kharagezov D. A. – bibliography preparation;

Galina A. V. – technical editing;

Kiblickskaya A. A. – manuscript writing, technical editing;

Mindar M. V. – data analysis;

Kurbanova L. Z. – bibliography preparation.