

Экспериментальное изучение влияния иммобилизованных субтилизинов на работоспособность изолированного сердца крысы

Г.И. Байкалов^{1, 2}, Н.П. Леонов¹, П.Г. Мадонов^{1, 2}, К.И. Ершов^{1, 2}, Р.А. Князев², К.И. Бахарева¹, М.С. Солдатова¹

¹НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

Введение. В настоящее время в клиническую практику внедрена новая фармакологическая технология тромболитической терапии с использованием иммобилизованных субтилизинов (ИмС). В экспериментальных и клинических исследованиях показана высокая эффективность и безопасность лечения тромботических заболеваний с помощью лекарственного препарата Тромбовазим, созданного на основе ИмС. Несмотря на то, что данный лекарственный препарат широко изучен как тромболитик, его плюрипотентные фармакологические свойства не были детально изучены.

Цель. Изучить работоспособность изолированного сердца крысы при коронарной перфузии ИмС.

Материалы и методы. В исследовании использована модель изолированного сердца крысы по Лангендорфу. В эксперимент было включено 50 крыс линии Вистар. Животные были разделены на 5 групп (по 10 особей в каждой): 1-я группа – контрольная (сердца, перфузируемые раствором Кребса – Хензеляйта) и 4 опытные группы – сердца, перфузируемые ИмС в 4 концентрациях 170, 340, 510 и 1020 ЕД/л соответственно. Оценивался показатель работоспособности изолированного сердца, отражающий фактическую работу сердечной мышцы и выражаемый как произведение частоты сердечных сокращений и силы ее сокращений в виде давления, развиваемого левым желудочком.

Результаты. Не обнаружено отрицательного влияния ИмС на изменение работоспособности изолированного сердца крысы. Выявлена тенденция увеличения работоспособности в первые 5 мин применения ИмС. Достижение максимума и длительность этого эффекта зависит от концентрации ИмС в перфузируемом растворе. При концентрации 170 ЕД/л очевидный прирост эффекта обнаруживается с 10-й минуты, при более высоких концентрациях – с 5-й минуты. Длительность нарастания эффекта при применении доз 170–510 ЕД/л сохраняется до 20-й минуты, при применении ИмС в дозе 1020 ЕД/л – до 30-й минуты. Возврат показателей работоспособности к исходным значениям наблюдается при применении ИмС в дозе 170 ЕД/л на 30-й минуте, в дозе 340 ЕД/л – на 40-й минуте. При перфузии раствором ИмС в концентрациях 510 и 1020 ЕД/л к 40-й минуте эффект увеличения работоспособности ослабевает, но остается все же более высоким по сравнению с исходными показателями.

Заключение. Полученные экспериментальные данные показывают, что ИмС увеличивают работоспособность сердца. Данное обстоятельство позволит расширить применение лекарственного препарата Тромбовазим в условиях катастрофы коронарного кровообращения.

Ключевые слова: работоспособность сердца, иммобилизованные субтилизины, Тромбовазим, изолированное сердце.

Образец цитирования: Байкалов Г.И., Леонов Н.П., Мадонов П.Г., Ершов К.И., Князев Р.А., Бахарева К.И., Солдатова М.С. Экспериментальное изучение влияния иммобилизованных субтилизинов на работоспособность изолированного сердца крысы // Journal of Siberian Medical Sciences. 2022;6(3):57–71. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-3-57-71

Поступила в редакцию 26.04.2022
Прошла рецензирование 31.08.2022
Принята к публикации 10.09.2022

Автор, ответственный за переписку
Байкалов Герман Игоревич: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: gbaikalov@yandex.ru

Received 26.04.2022
Revised 31.08.2022
Accepted 10.09.2022

Corresponding author
German I. Baikarov: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: gbaikalov@yandex.ru

Experimental study of the immobilized subtilisins' effect on the performance of an isolated rat heart

G.I. Baikalov^{1, 2}, N.P. Leonov¹, P.G. Madonov^{1, 2}, K.I. Ershov^{1, 2}, R.A. Knyazev², K.I. Bakhareva¹, M.S. Soldatova¹

¹Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

Introduction. Currently, a new pharmacological technology of thrombolytic therapy using immobilized subtilisins (ISs) has been introduced into clinical practice. Experimental and clinical studies have shown the high efficacy and safety of the treatment of thrombotic diseases using the drug Thrombovasim[®], created on the basis of ISs. Although this drug has been widely studied as a thrombolytic, its pluripotent pharmacological properties have not been studied in detail.

Aim. To study the performance of an isolated rat heart under the coronary perfusion with ISs.

Materials and methods. The Langendorff's perfused heart model was used in the study. The experiment included 50 Wistar rats. Animals were divided into 5 groups (10 animals each): group 1 – control (hearts perfused with Krebs-Henseleit solution) and 4 experimental groups – hearts perfused with ISs at 4 concentrations of 170, 340, 510 and 1020 IU/l respectively. The performance indicator of an isolated heart was assessed, reflecting the actual work of the heart muscle and expressed as the product of the heart rate and the strength of its contractions in the form of the pressure developed by the left ventricle.

Results. No negative ISs effect on the performance of the isolated rat heart was found. A tendency to increase the performance in the first 5 minutes of using ISs was revealed. The achievement of the maximum and the duration of this effect depend on the ISs contents in perfusate. At a concentration of 170 IU/l, an obvious increase in the effect is found from the 10th minute, at higher concentrations – from the 5th minute. The duration of the increasing performance effect when using doses of 170–510 IU/l is maintained up to the 20th minute, when using ISs at a dose of 1020 IU/l – up to the 30th minute. The return of the performance indicators to the baseline values is observed at the 30th minute, at a dose of 340 IU/l – at the 40th minute. When perfused with a solution of ISs at concentrations of 510 and 1020 IU/l, by the 40th minute, the effect of increasing performance weakens, but the parameters still remain at higher levels as compared to those at baseline.

Conclusion. The experimental data obtained show that ISs increase the performance of the heart. This circumstance will allow expanding the use of the drug Thrombovasim[®] in a catastrophe of the coronary circulation.

Keywords: heart performance, immobilized subtilisins, Thrombovasim[®], isolated heart.

Citation example: Baikalov G.I., Leonov N.P., Madonov P.G., Ershov K.I., Knyazev R.A., Bakhareva K.I., Soldatova M.S. Experimental study of the immobilized subtilisins' effect on the performance of an isolated rat heart. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022;6(3):57–71. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-3-57-71

ВВЕДЕНИЕ

Для экспериментальных исследований сердечно-сосудистой системы существуют различные модели. Одной из них является модель перфузии изолированного сердца крысы. Данная модель позволяет детально исследовать физиологические и биохимические процессы в органе, а также внешние воздействия на него в условиях отсутствия системных нейрогенных и гуморальных факторов регуляции работы сердца. Одной из моделей изолированного сердца является метод Лангендорфа (O. Langendorff) [1]. Принцип работы сердца по Лангендорфу заключается в том, что перфузионный раствор поступает в аорту через канюлю. Аортальный клапан закрывается за счет давления в аорте, и перфузионный

INTRODUCTION

There are various models for experimental studies of the cardiovascular system. One of them is the isolated perfused heart model. This model makes it possible to study in detail the physiological and biochemical processes in the organ, as well as the external influences in the absence of systemic neurogenic and humoral factors regulating the work of the heart. One of the isolated heart models is the Langendorff's technique (O. Langendorff) [1]. The principle of the heart according to Langendorff is that the perfusion solution enters the aorta through a cannula. The aortic valve closes due to the pressure in the aorta, and the perfusion solution enters only the coronary arteries. After passing the micro-circulatory bed of the heart, the solution is col-

раствор поступает только в коронарные артерии. Пройдя микроциркуляторное русло сердца, раствор собирается по системе вен сердца в коронарный синус и далее поступает в правое предсердие. На рис. 1 представлена схема установки для работы на изолированном по Лангендорфу сердце крысы.

Движение перфузионного раствора по изолированному сердцу практически полностью моделирует коронарную перфузию миокарда и позволяет оценивать влияние исследуемых препаратов на многочисленные физиологические и биохимические параметры работы сердца. Это обстоятельство дает основания для проведения как скрининговых, так и прецизионных фармакологических исследований лекарственных препаратов [2–7]. В настоящее время в клиническую практику внедрена новая фармакологическая технология тромболитической терапии с использованием иммобилизованных субтилизинов (ИмС). В экспериментальных и клинических исследованиях показана высокая эффективность и безопасность лечения тромботических заболе-

lected through the heart venous system into the coronary sinus, and then enters the right atrium. Fig. 1 shows an apparatus unit diagram for working on the Langendorff-isolated perfused rat heart.

The movement of the perfusion solution through the isolated heart almost completely simulates the coronary perfusion of the myocardium and makes it possible to evaluate the effect of the studied drugs on numerous physiological and biochemical parameters of the heart. This circumstance provides grounds for conducting both screening and precision pharmacological studies of drugs [2–7]. Currently, a new pharmacological technology of thrombolytic therapy using immobilized subtilisins (ISs) has been introduced into clinical practice. Experimental and clinical studies have shown high efficacy and safety in the treatment of thrombotic diseases with the use of the drug Thrombovasim[®], created on the basis of ISs [8–10]. This drug has been widely studied as a thrombolytic, but its pluripotent pharmacological properties have not been studied in detail. This circumstance was the basis for carrying out experimental work to study the effect of ISs on the work of an isolated heart.

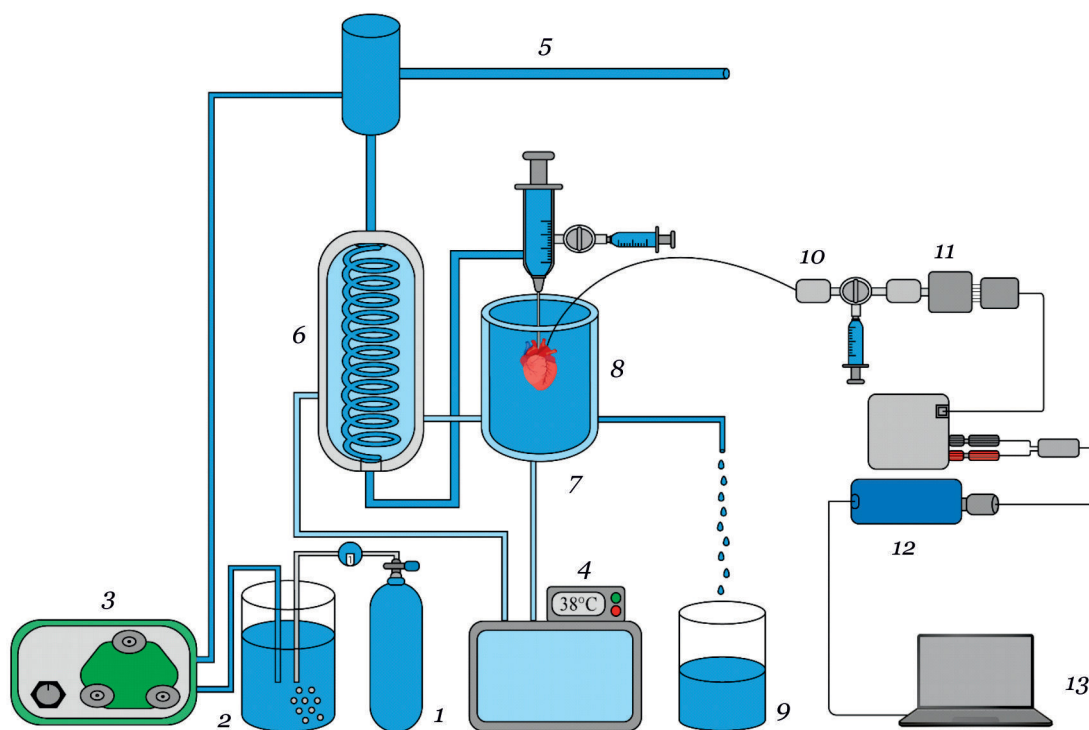


Рис. 1. Схема установки для перфузии изолированного сердца крысы: 1 – карбоген; 2 – емкость с перфузионным раствором; 3 – перистaltический насос; 4 – термостатическая водяная баня; 5 – мерная трубка; 6 – нагревательная спираль; 7 – ванночка для сердца; 8 – сердце; 9 – емкость для сбора оттекающего перфузата; 10 – катетер с латексным баллончиком; 11 – цифровой датчик давления; 12 – аналогово-цифровой преобразователь; 13 – персональный компьютер

Fig. 1. Langendorff apparatus setup diagram for perfusion of the isolated rat heart: 1 – carbogen; 2 – container with perfusion solution; 3 – peristaltic pump; 4 – thermostatic water bath; 5 – measuring tube; 6 – heating coil; 7 – heart bath; 8 – heart; 9 – container for collecting the outflowing perfusate; 10 – catheter with a latex balloon; 11 – digital pressure sensor; 12 – analog-to-digital converter; 13 – personal computer

ваний с помощью лекарственного препарата Тромбовазим, созданного на основе ИмС [8–10]. Данный лекарственный препарат широко изучен как тромболитик, но его плюрипотентные фармакологические свойства не были детально изучены. Это обстоятельство явилось основанием для проведения экспериментальных работ по изучению влияния ИмС на работу изолированного сердца.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить работоспособность изолированного сердца крысы под воздействием коронарной перфузии ИмС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Расчет выборки проведен в соответствии с рекомендациями по определению размера выборки для доклинических исследований на лабораторных животных [11]. Согласно расчетам для проведения исследования необходимый размер выборки составил 10 животных в группе, что для 5 групп эквивалентно 50 животным и соответствует 80 % мощности и 5 % статистической значимости.

Лабораторные животные. Эксперименты по изучению влияния ИмС на работоспособность сердца были выполнены *ex vivo* на 50 изолированных сердцах крыс-самцов линии Вистар. Если после торакотомии при визуальном осмотре у животных обнаруживались патологические изменения в легких, избыточное накопление жира в сердце, такие сердца были исключены из эксперимента. Эксперимент предусматривал формирование 5 групп (10 животных в каждой) по составу раствора, которым осуществлялась перфузия изолированного сердца:

1. Контрольная группа – перфузия раствором Кребса – Хензеляйта.
2. Опытная группа 1 – перфузия раствором ИмС в концентрации 170 ЕД/л.
3. Опытная группа 2 – перфузия раствором ИмС в концентрации 340 ЕД/л.
4. Опытная группа 3 – перфузия раствором ИмС в концентрации 510 ЕД/л.
5. Опытная группа 4 – перфузия раствором ИмС в концентрации 1020 ЕД/л.

Методология эксперимента. Показатель работоспособности изолированного сердца (Р) отражает фактическую работу сердечной мышцы и выражается как произведение частоты сердечных сокращений (ЧСС) и силы ее сокращений в виде давления, развиваемого левым желудочком (ДЛЖ)

$$P (\text{мм рт. ст.} \cdot \text{мин}^{-1}) = \text{ЧСС} \cdot \text{ДЛЖ}.$$

AIM OF THE RESEARCH

To study the performance of an isolated rat heart under the coronary perfusion with ISs.

MATERIALS AND METHODS

The sample calculation was carried out in accordance with the recommendations for determining the sample size for preclinical studies on laboratory animals [11]. According to the calculations for the study, the required sample size was 10 animals per group, which for 5 groups is equivalent to 50 animals and corresponds to 80% power and 5% statistical significance.

Laboratory animals. Experiments to study the ISs effect on the performance of the heart were carried out *ex vivo* on 50 isolated hearts of male Wistar rats. If on thoracotomy the visual examination of the animals revealed pathological changes in the lungs, an excessive accumulation of fat in the heart, such hearts were excluded from the experiment. The experiment involved the formation of 5 groups (10 animals each) according to the composition of the solution used to perfuse the isolated heart:

1. Control group – perfusion with Krebs-Henseleit solution.
2. Experimental group 1 – perfusion with an ISs solution at a concentration of 170 IU/l.
3. Experimental group 2 – perfusion with an ISs solution at a concentration of 340 IU/l.
4. Experimental group 3 – perfusion with an ISs solution at a concentration of 510 IU/l.
5. Experimental group 4 – perfusion with an ISs solution at a concentration of 1020 IU/l.

Methodology of the experiment. The performance indicator of an isolated heart (P) reflects the actual work of the heart muscle and is expressed as the product of the heart rate (HR) and the strength of its contractions in the form of the pressure developed by the left ventricle (LVP)

$$P (\text{mm Hg} \cdot \text{min}^{-1}) = \text{HR} \cdot \text{LVP}.$$

Coronary perfusion was performed according to the Langendorff method at a constant pressure of 80 mm Hg [1]. The stock solvent and control perfusion preparation was the Krebs-Henseleit solution (pH – 7.4, temperature – 37.5°C). Cardiac oxygenation was provided by saturation of the perfusion solution with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). The isolated heart worked for at least 15 min without recirculation of the perfusion solution until constant pressure in the left ventricle and the rate of contractions were established. Then, the studied component was added to the perfusion solution, and the heart worked in the recirculation mode for 40 min. There

Коронарная перфузия проводилась по методике Лангендорфа при постоянном давлении 80 мм рт. ст. [1]. Базовым растворителем и контрольным перфузионным препаратом был раствор Кребса – Хензеляйта (рН – 7.4, температура – 37.5 °C). Оксигенация сердца обеспечивалась насыщением перфузионного раствора карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂). Выделенное сердце работало не менее 15 мин без рециркуляции перфузионного раствора до установления постоянных показателей давления в левом желудочке и частоты сокращений. Затем в перфузионный раствор вносили исследуемый компонент, и сердце работало в режиме рециркуляции в течение 40 мин. Предусмотрено 6 контрольных точек для регистрации параметров ЧСС и ДЛЖ: начало перфузии исследуемым препаратом – точка 0, далее 5, 10, 20, 30, 40-я минуты перфузии. Запись и регистрация показателей ЧСС и ДЛЖ осуществлялась при помощи программы DiSco 3.46.1.1 (ООО «Мотор-Мастер», Россия). Фрагмент записи представлен на рис. 2.

Для подсчета ЧСС на графике отмеряли 6 с и определяли, сколько пиков максимального давления в левом желудочке осуществляется за данный промежуток времени (см. рис. 2). Далее пересчет производили в минуты (уд./мин). Для регистрации ДЛЖ в левом предсердии за ушком делали разрез, затем через него вводили латексный баллончик, который наполняли изотоническим раствором хлорида натрия до необходимого объема и соединяли с цифровым датчиком давления. Далее сигнал посту-

are 6 test points specified for recording heart rate and LVP parameters: the beginning of perfusion with the test drug – point 0, then 5, 10, 20, 30, 40 minutes of perfusion. Recording and registration of heart rate and LVP parameters were carried out using a DiSco 3.46.1.1 program (Motor-Master LLC, Russia). A fragment of the recording is shown in Fig. 2.

To calculate the heart rate, 6 s were measured on the graph and it was determined how many peaks of the maximum pressure in the left ventricle occurred during a given period of time (see Fig. 2). Further recalculation was carried out in minutes (beats/min). To register the LVP, an incision was made behind the left atrial appendage, then a latex balloon was inserted through it, which was filled with isotonic sodium chloride solution to the required volume and connected to a digital pressure sensor. Next, the signal went to an analog-to-digital converter and then to a personal computer (see Fig. 1). Firstly, the balloon was inserted into the atrial cavity, and then through the mitral valve into the cavity of the left ventricle. The volume of liquid supplied to the balloon was determined on the graph along the lower border of the red vertical scale up to the mark equal to 0.25 V. Data on the strength of contraction of the left ventricle are presented as voltage in volts (peak height), measured on a DiSco 2 oscilloscope (Motor-Master LLC, Russia). A conversion factor ($k = 0.0093$) is provided to convert LVP data from volts to millimeters of mercury based on the calibration of the digital pressure transducer. At the end of

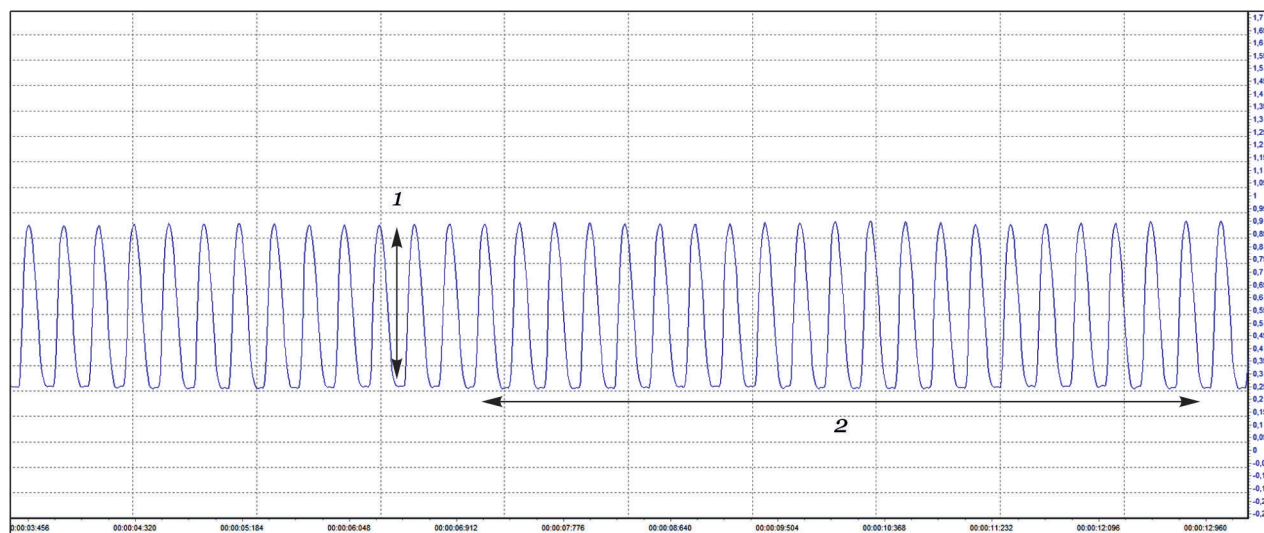


Рис. 2. Фрагмент записи осциллограммы работы левого желудочка: 1 – максимальное давление, создаваемое левым желудочком; 2 – участок записи для определения количества пиков максимального давления левого желудочка для расчета частоты сокращений сердца в 1 мин

Fig. 2. A fragment of the oscillogram recording of the left ventricle: 1 – the maximum pressure developed by the left ventricle; 2 – site of the recording to determine the number of peaks of the maximum pressure of the left ventricle to calculate the heart rate in 1 min

пал на аналогово-цифровой преобразователь и затем на персональный компьютер (см. рис. 1). Баллончик вводили сначала в полость предсердия, а затем через митральный клапан – в полость левого желудочка. Объем жидкости, подаваемый в баллончик, определяли на графике по нижней границе красной вертикальной шкалы до отметки, равной 0.25 В. Данные о силе сокращения левого желудочка представлены как напряжение в вольтах (высота пика), измерявшееся на осциллографе DiSCO 2 (ООО «Мотор-Мастер», Россия). Для перевода данных ДЛЖ из вольт в миллиметры ртутного столба предусмотрен коэффициент пересчета ($k = 0.0093$) на основе калибровки цифрового датчика давления. По окончании эксперимента полученные данные высоты пика вносили в таблицу Excel, и программа автоматически пересчитывала значения из вольт в миллиметры ртутного столба.

Исследуемый препарат. ИмС представляют собой фармацевтическую субстанцию лекарственного препарата Тромбовазим с ферментативной активностью 5400 ЕД в грамме сухого вещества (производитель – АО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», Новосибирск, Россия). Исследуемый препарат – лиофилизированный порошок светло-желтого цвета, легко растворяющийся в кристаллоидных и коллоидных растворах.

Методы статистической обработки. Статистический анализ данных проведен с использованием программ MedCalc 11.3.3 (MedCalc Software), STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.) и Microsoft Office Excel 2007. Показатели работоспособности в группах на этапах исследования, а также разность показателей работоспособности между контрольными точками (этапами) исследования (ΔT) представлены как среднее и стандартное отклонение или как медианные и межквартильные диапазоны. Проверка нормальности распределения количественных признаков проведена с использованием критерия Шапиро – Уилка. Для данных, имеющих нормальное распределение, использовался F-тест для проверки предположения об однородности дисперсий. Для межгруппового сравнения повторных измерений использован дисперсионный анализ повторных измерений (RM-ANOVA). Учитывая, что часть данных имела отличное от нормального распределение и некоторые данные показывали негомогенность дисперсий, перед проведением RM-ANOVA выполнена логарифмическая трансформация данных. При проведении RM-ANOVA оценивался коэффициент сферичности Гринхауса – Гейссера, который использован в качестве поправочного коэффициента, примененного к степеням свободы, используемым для рас-

the experiment, the obtained peak height data were entered into an Excel spreadsheet, and the program automatically recalculated the values from volts to millimeters of mercury.

The investigational drug. ISs is a pharmaceutical substance of the drug Thrombovasim® with an enzymatic activity of 5400 IU per gram of dry matter (manufactured by Siberian Center for Pharmacology and Biotechnology JSC, Novosibirsk, Russia). The test drug is a light yellow lyophilized powder, easily soluble in crystalloid and colloid solutions.

Statistical processing methods. Statistical data analysis was carried out using MedCalc 11.3.3 (MedCalc Software), STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.) and Microsoft Office Excel 2007. Performance indicators in groups at the stages of the study, as well as the difference in performance indicators between test points (stages) of the study (ΔT) are presented as mean and standard deviation or as median and interquartile ranges. Checking the normality of the distribution of quantitative variables was carried out using the Shapiro-Wilk test. For normally distributed data, an F-test for homogeneity of the variances was used. Repeated-measure analysis of variance (RM-ANOVA) was used for the intergroup comparison. Considering that some of the data had a different distribution from normal and some data showed inhomogeneity of variances, a logarithmic transformation of the data was performed before RM-ANOVA. During the RM-ANOVA the Greenhouse-Geisser sphericity index was estimated, which is used as a correction factor applied to the degrees of freedom used to calculate the p for the observed value of F . The results of RM-ANOVA are presented as an intergroup effects – BSE (Between-Subjects Effect – difference between groups) and intragroup effects – WSE (Within-Subjects Effect, while F – difference between measurements and $G \cdot F$ – difference between measurements depending on group membership). After RM-ANOVA, post hoc analyses were performed in the presence of significant ($p < 0.05$) intergroup and intragroup effects. The Friedman test was used for intragroup analysis repeated measurements followed by posteriori comparison using the Wilcoxon test with the Bonferroni correction for p value. The Kruskal-Wallis test was used for intergroup analysis of quantitative indicators, followed by a posteriori comparison using the Conover-Iman test.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 and Fig. 3 shows the values of the heart performance indicator during perfusion of an isolated heart with ISs solution at the studied concentration and the Krebs-Henseleit buffer at the stages

чета значения p для наблюдаемого значения F . Результаты RM-ANOVA представлены как межгрупповой эффект – BSE (разница между группами) и внутригрупповые эффекты – WSE (F – разница между измерениями и $G \cdot F$ – разница между измерениями в зависимости от принадлежности к группе). После проведения RM-ANOVA при наличии значимых ($p < 0.05$) межгрупповых и внутригрупповых эффектов выполнены post hoc анализы. Тест Фридмана использовался для внутригруппового анализа повторных измерений с последующим апостериорным сравнением с помощью теста Вилкоксона с применением поправки Бонферрони к значению p , тест Краскела – Уоллиса – для межгруппового анализа количественных показателей с последующим апостериорным сравнением с помощью теста Коновера – Имана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 и на рис. 3 представлены значения показателя работоспособности при перфузии изолированного сердца раствором ИмС в исследуемых концентрациях и раствором Кребса – Хензеляйта на этапах исследования. По результатам дисперсионного анализа повторных измерений не выявлено различий работоспособности между группами, но имелось различие показателей на этапах исследования внутри групп, а также различие

of the study. According to the results of the analysis of variance of repeated measurements, there were no differences in the heart performance between groups, but there were differences in indicators at the stages of the study within the groups, as well as a difference in changes in the performance at the stages of the study, depending on the group the animal belongs to.

Analyzing the obtained data, one can note a tendency to an increase in the performance of the heart from the first minutes of perfusion with the ISs solution and reaching its maximum values at the 20th minute when using doses of 170, 340 and 510 IU/l. In the group of perfusion with ISs at a concentration of 1020 IU/l, the maximum peak of the increase in the performance was observed at the 30th minute of the study. A small increase in the performance in the control group by the 20th minute of perfusion is explained by the effect of reperfusion of the heart.

We have calculated the increase (difference) in the performance indicator (ΔT) of the studie groups at the stages of the study and compared it with the control group (Table 2).

When evaluating the overall increase in myocardial performance throughout the experiment (from 0 to 40 min of perfusion), no differences were found between the groups (Fig. 4), which confirms the data of the statistical analysis using the presented above RM-ANOVA.

Таблица 1. Показатели работоспособности сердца (мм рт. ст. · мин⁻¹)

Table 1. Cardiac performance indicators (mm Hg · min⁻¹)

Группа Group	0 мин 0 min	5 мин 5 min	10 мин 10 min	20 мин 20 min	30 мин 30 min	40 мин 40 min	p
ИмС 170 ЕД/л ISs 170 IU/l ($n = 10$)	17 115 ± 3113	17 847 ± 3062	19 100 ± 3233*	19 896 ± 4120*	18 396 ± 2997	17 248 ± 2354	<0.001†
ИмС 340 ЕД/л ISs 340 IU/l ($n = 10$)	17 484 ± 3585	19 142 ± 3590*	20 329 ± 3872*	21 858 ± 3548*	19 712 ± 3355*	18 048 ± 3005	<0.001†
ИмС 510 ЕД/л ISs 510 IU/l ($n = 10$)	17 073 ± 5073	17 917 ± 4606*	19 085 ± 4954*	19 580 ± 5485*	18 774 ± 5015*	17 752 ± 4510*	<0.001†
ИмС 1020 ЕД/л ISs 1020 IU/l ($n = 10$)	16 965 ± 4308	18 268 ± 4757*	18 928 ± 4386*	19 696 ± 4267*	20 081 ± 4369*	19 151 ± 4788*	<0.001†
Контроль Control ($n = 10$)	15 928 ± 1529	16 032 ± 1537	16 839 ± 1680*	16 959 ± 1712*	16 937 ± 1661*	16 833 ± 1618*	<0.001†
p	0.91*	0.45*	0.37*	0.13*	0.35*	0.76**	

П р и м е ч а н и я : Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; RM-ANOVA: коэффициент сферичности Гринхауса – Гейссера = 0.696; BSE-G: $F = 0.72$, $p = 0.584$; WSE-F: $F = 46.32$, $p < 0.001$; WSE-F · G: $F = 3.1$, $p < 0.001$.

* ANOVA; ** тест Краскела – Уоллиса; † тест Фридмана; * $p < 0.0083$ тест Вилкоксона для парных выборок (сравнение с начальным этапом).

Notes: Data are presented as mean ± standard deviation; RM-ANOVA: Greenhouse-Geisser sphericity index = 0.696; BSE-G: $F = 0.72$, $p = 0.584$; WSE-F: $F = 46.32$, $p < 0.001$; WSE-F · G: $F = 3.1$, $p < 0.001$.

* ANOVA; ** Kruskal-Wallis test; † Friedman test; * $p < 0.0083$ Wilcoxon test for paired samples (comparison with baseline).

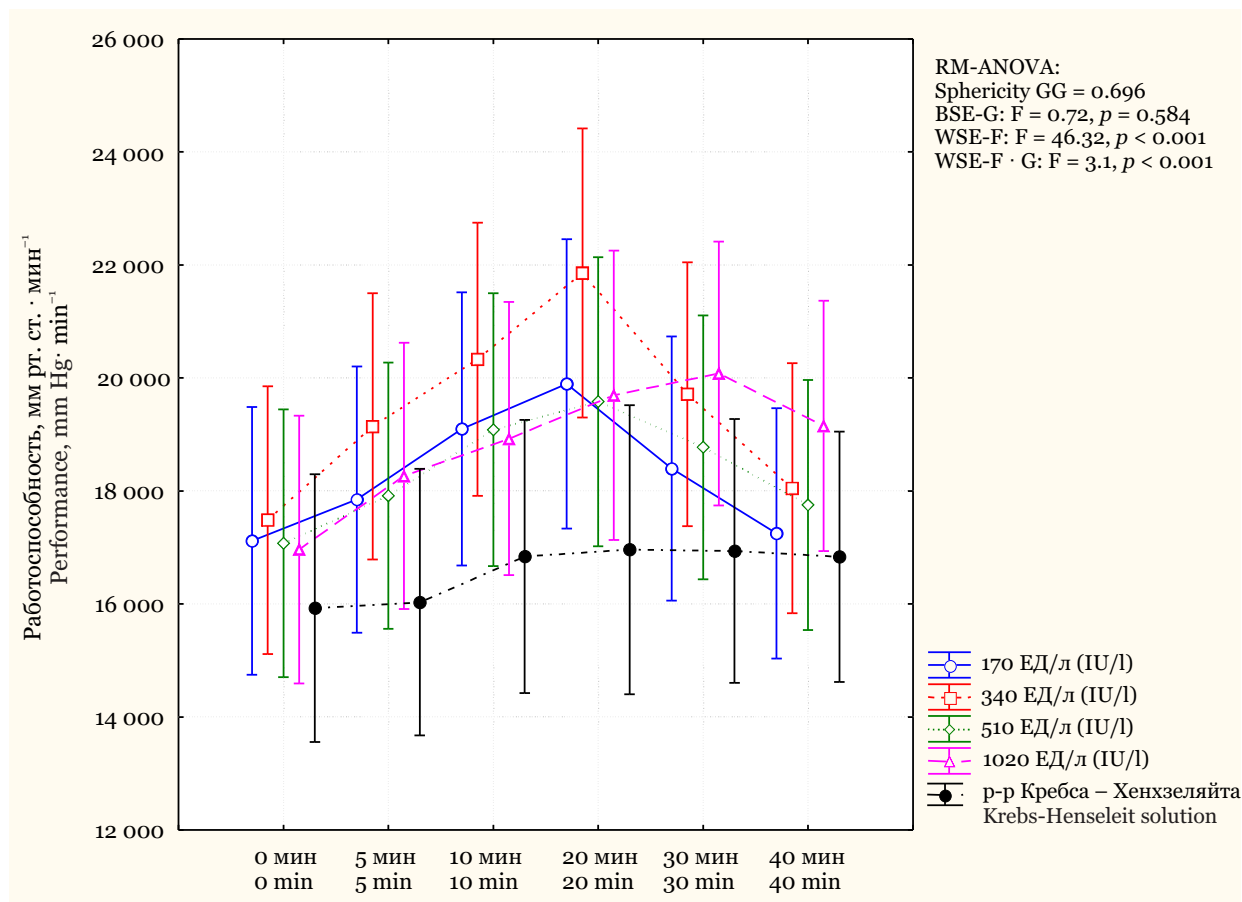


Рис. 3. Динамика работоспособности изолированного сердца в группах исследования
Fig. 3. The dynamics of the performance of an isolated heart in the study groups

изменения работоспособности на этапах исследования в зависимости от принадлежности к группе.

Анализируя полученные данные, можно отметить тенденцию к увеличению работоспособности сердца с первых минут перфузии раствором ИмС и достижением ее максимальных значений на 20-й минуте при применении доз 170, 340 и 510 ЕД/л. В группе перфузии ИмС в концентрации 1020 ЕД/л максимальный пик увеличения работоспособности наблюдался на 30-й минуте исследования. Небольшой прирост работоспособности в контрольной группе к 20-й минуте перфузии объясняется эффектом реперфузии сердца.

Нами проведен расчет прироста (разности) показателя работоспособности (ΔT) исследуемых групп на этапах исследования и его сравнение с контрольной группой (табл. 2).

При оценке общего прироста работоспособности миокарда на протяжении всего эксперимента (с 0-й по 40-ю минуту перфузии) не выявлено различий между группами (рис. 4), что подтверждают данные статистического анализа методом RM-ANOVA, представленного выше.

Along with this, the analysis of the dynamics of the increase in the myocardial performance at the stages of the study shows the difference between the experimental and control groups. Fig. 5 shows the increase in the performance from the 0th to the 5th minute of perfusion. In all experimental groups, there is a marked increase in the performance compared with the control group ($p < 0.05$), which is due to a large LVP increase in the experimental groups compared with the control group ($p < 0.0006$ according to the Kruskal-Wallis test) and characterizes the onset of a positive inotropic effect of ISs.

In the periods from the 5th to the 10th and from the 10th to the 20th minute of perfusion, there were no differences in the dynamics of the performance between the experimental and control groups (Fig. 6 and 7). This is explained by a decrease in the heart rate ($p = 0.0001$ and $p = 0.028$ according to the Kruskal-Wallis test) in response to a more pronounced LVP increase ($p = 0.0001$ and $p = 0.0024$ according to the Kruskal-Wallis test) in the experimental groups compared with the control group, and indicates the preservation of a positive inotropic effect of ISs.

Таблица 2. Разность (ΔT) изменения работоспособности в опытных и контрольной группах на этапах исследования**Table 2.** Difference (ΔT) of changes in the heart performance in the experimental and control groups at the stages of the study

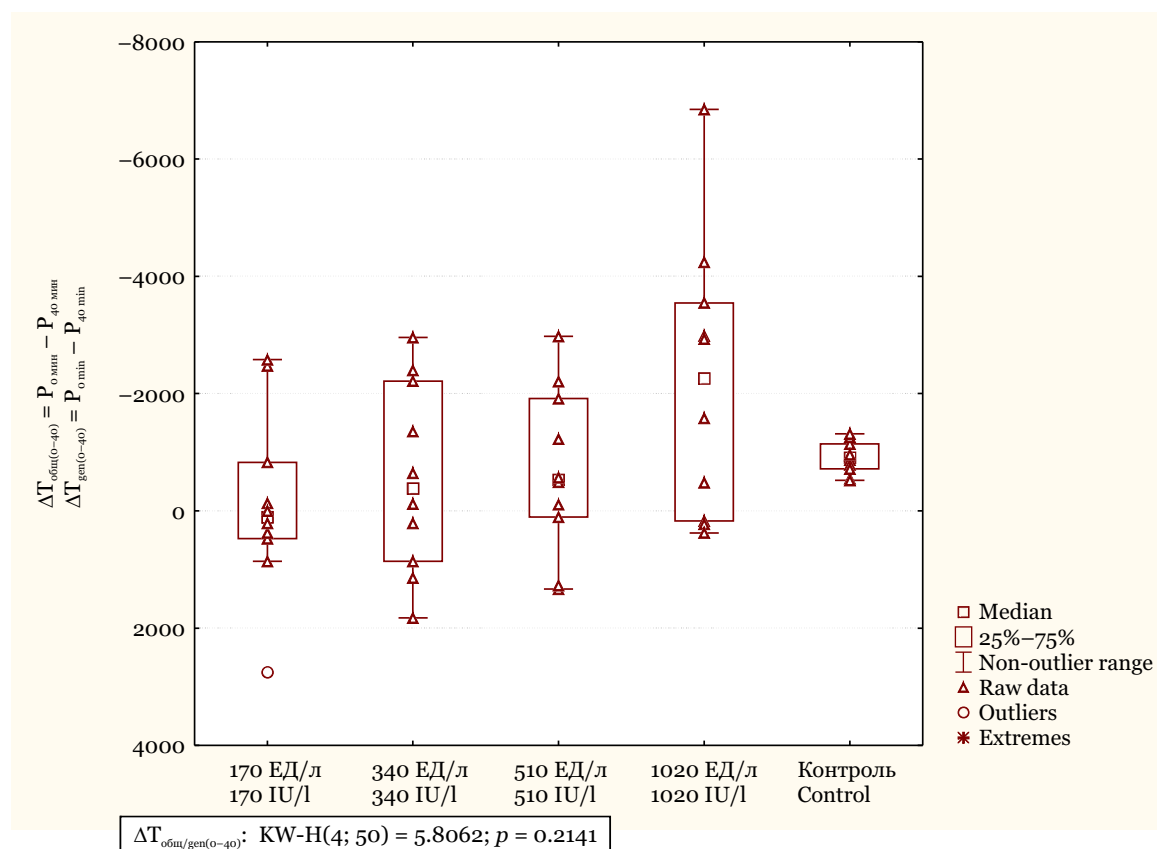
Группа Group	$\Delta T_{1(0-5)}$	$\Delta T_{2(5-10)}$	$\Delta T_{3(10-20)}$	$\Delta T_{4(20-30)}$	$\Delta T_{5(30-40)}$	$\Delta T_{\text{общ}(0-40)}$
ИмС 170 ЕД/л ISs 170 IU/l (n = 10)	-991 (-2628; 645)*	-1070 (-1505; -430)	-1151 (-2473; 1290)	1339 (742; 2036)*	1226 (161; 1699)*	108 (-828; 473)
ИмС 340 ЕД/л ISs 340 IU/l (n = 10)	-1452 (-2258; -1075)*	-1263 (-1806; -323)	-1285 (-1677; -1075)	2387 (2043; 2581)*	1817 (1237; 2194)*	-382 (-2215; 860)
ИмС 510 ЕД/л ISs 510 IU/l (n = 10)	-672 (-2022; -323)*	-968 (-1484; -408)	59 (-1355; 538)	1253 (-215; 1656)*	1285 (43; 1656)*	-532 (-1914; 108)
ИмС 1020 ЕД/л ISs 1020 IU/l (n = 10)	-1075 (-2032; -430)*	-554 (-1290; -54)	-962 (-1290; -548)	-860 (-1086; 710)	1188 (54; 2462)*	-2258 (-3548; 172)
Контроль Control (n = 10)	48 (-339; 113)	-869 (-1051; -661)	-100 (-250; 0)	67 (-120; 147)	49 (-16; 253)	-906 (-1142; -716)
p	0.0077*	0.64*	0.06*	0.0001*	0.016*	0.21*

П р и м е ч а н и я : Данные представлены как медиана (25-й; 75-й процентиль).

* $p < 0.05$ тест Коновера – Инмана (сравнение с контрольной группой); * тест Краскела – Уоллиса.

N o t e s : Data are presented as median (25th; 75th percentile).

* $p < 0.05$ Conover-Inman test (comparison with the control group); * Kruskal-Wallis test.

**Рис. 4.** Прирост работоспособности в опытных и контрольной группах в интервале с 0-й по 40-ю минуту перфузии ($\Delta T_{\text{общ}(0-40)}$)**Fig. 4.** The increase of the heart performance in the experimental and control groups from the 0th to the 40th minute of perfusion ($\Delta T_{\text{gen}(0-40)}$)

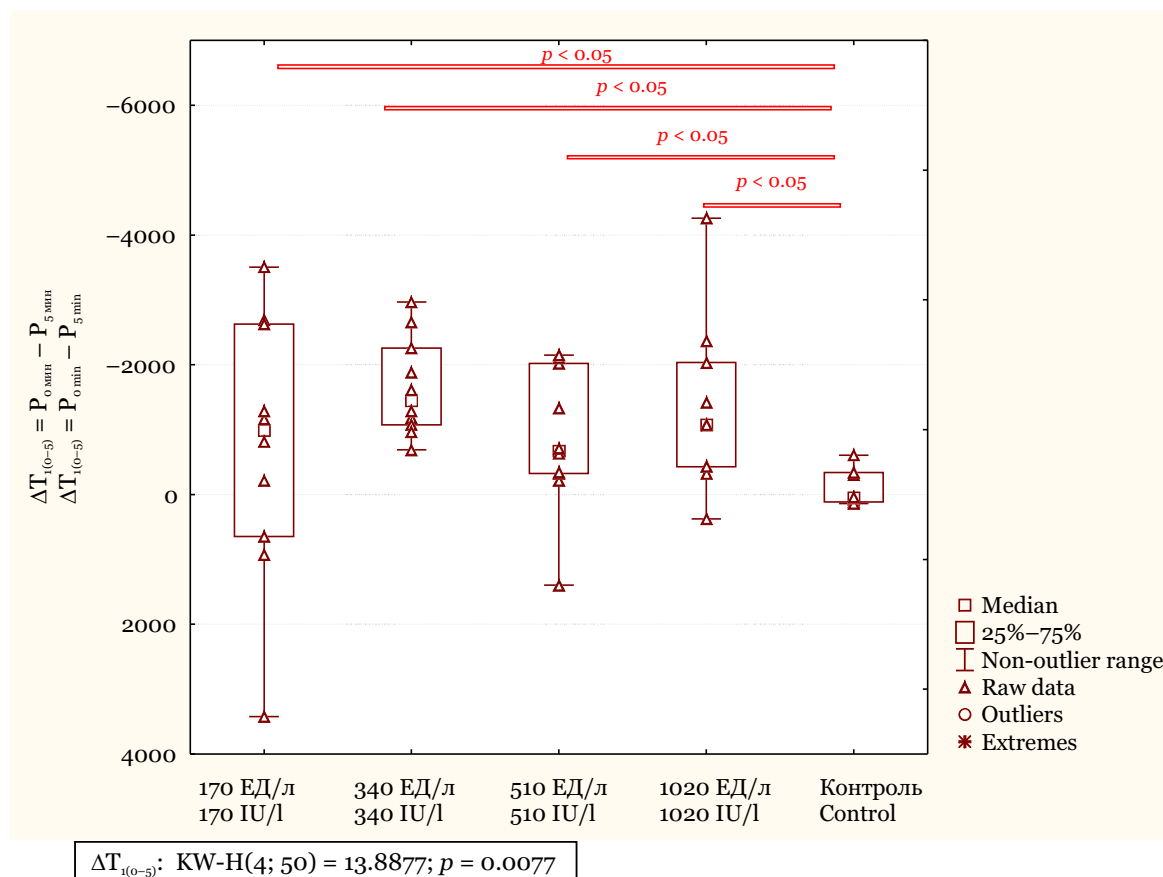


Рис. 5. Прирост работоспособности в опытных и контрольной группах в течение первых 5 минут перфузии ($\Delta T_{(0-5)}$)
Fig. 5. The increase of the performance in the experimental and control groups during the first 5 minutes of perfusion ($\Delta T_{(0-5)}$)

Наряду с этим, анализ динамики прироста работоспособности миокарда на этапах исследования показывает различие между опытными и контрольной группами. На рис. 5 представлен прирост работоспособности за период с 0-й по 5-ю минуту перфузии. Во всех опытных группах отмечается выраженный прирост работоспособности по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$), что обусловлено большим приростом ДЛЖ в опытных группах по сравнению с контрольной ($p < 0.0006$ по данным теста Краскела – Уоллиса) и характеризует начало положительного инотропного действия ИмС.

В периоды с 5-й по 10-ю и с 10-й по 20-ю минуты перфузии различий в динамике работоспособности между опытными и контрольной группами не выявлено (рис. 6 и 7). Это объясняется снижением ЧСС ($p = 0.0001$ и $p = 0.028$ по данным теста Краскела – Уоллиса) в ответ на больший прирост ДЛЖ ($p = 0.0001$ и $p = 0.0024$ по данным теста Краскела – Уоллиса) в опытных группах по сравнению с контрольной и свидетельствует о сохранении положительного инотропного эффекта ИмС.

In the interval from the 20th to the 30th minute of perfusion (Fig. 8), in groups with perfusate ISs concentrations of 170, 340 and 510 IU/l, and in the interval from the 30th to the 40th minute of perfusion in all experimental groups (Fig. 9), we revealed a negative dynamics of the increase in the heart performance compared with the control group ($p < 0.05$). These changes are characterized by a decrease in LVP ($p = 0.001$ and $p = 0.03$ according to the Kruskal-Wallis test) and its return to baseline, which characterizes a dose-dependent regression of the positive inotropic effect caused by ISs.

The study did not reveal any negative effect of ISs on the change in the performance of the isolated rat heart. On the contrary, there was a tendency to increase the performance in the first 5 minutes of ISs using. The achievement of the maximum and the duration of this effect depend on the ISs concentration in the perfused solution. At a concentration of 170 IU/l, an obvious increase in the effect is found from the 10th minute, at higher concentrations – from the 5th minute. The duration of the effect rising with the administration of ISs at doses of 170–510 IU/l lasts up to the 20th minute, at a dose of 1020 IU/l – up to the 30th minute. Then there is a

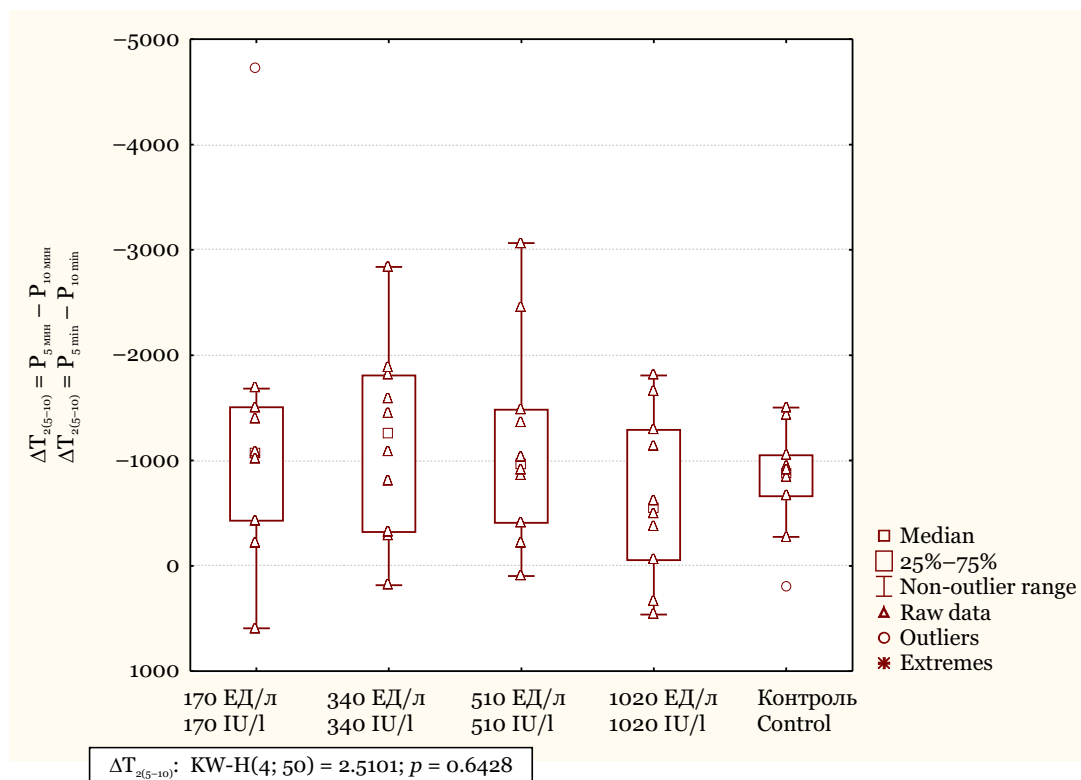


Рис. 6. Прирост работоспособности в опытных и контрольной группах с 5-й по 10-ю минуту перфузии ($\Delta T_{2(5-10)}$)
Fig. 6. The increase of the performance in the experimental and control groups from the 5th to the 10th minute of perfusion ($\Delta T_{2(5-10)}$)

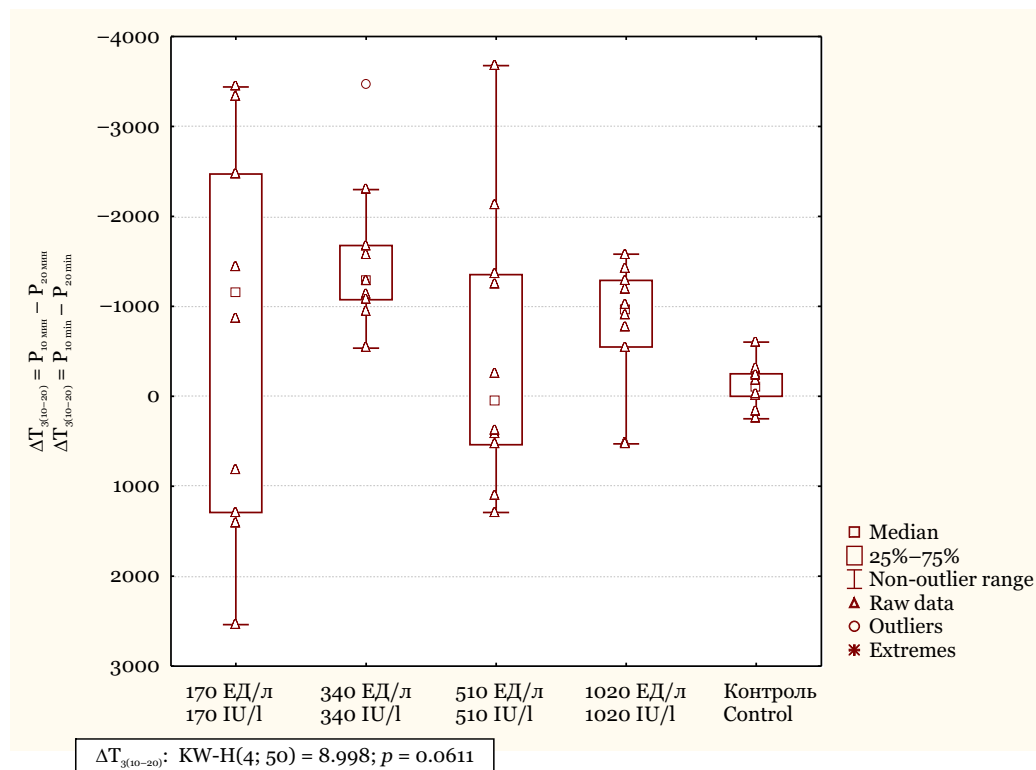


Рис. 7. Прирост работоспособности в опытных и контрольной группах с 10-й по 20-ю минуту перфузии ($\Delta T_{3(10-20)}$)
Fig. 7. The increase of the performance in the experimental and control groups from the 10th to the 20th minute of perfusion ($\Delta T_{3(10-20)}$)

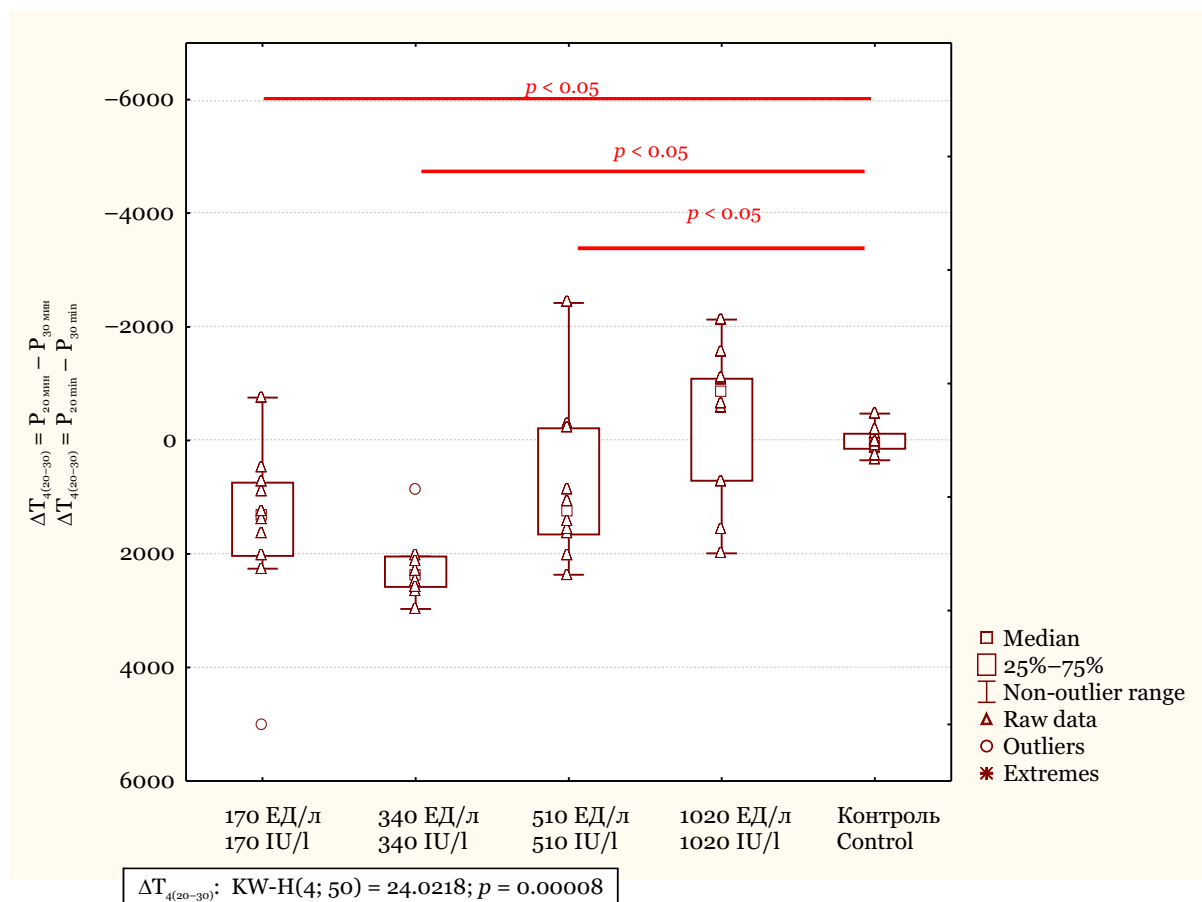


Рис. 8. Прирост работоспособности в опытных и контрольной группах с 20-й по 30-ю минуту перфузии ($\Delta T_{4(20-30)}$)
Fig. 8. The increase of the performance in the experimental and control groups from the 20th to the 30th minute of perfusion ($\Delta T_{4(20-30)}$)

В интервале с 20-й по 30-ю минуту перфузии (рис. 8) в группах с концентрациями ИмС в перфузате 170, 340 и 510 ЕД/л, а также в интервале с 30-й по 40-ю минуту перфузии во всех опытных группах (рис. 9) выявлена отрицательная динамика прироста работоспособности по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$). Данные изменения характеризуются уменьшением ДЛЖ ($p = 0.001$ и $p = 0.03$ по данным теста Краскела – Уоллиса) и возвращением его к исходным показателям, что характеризует дозозависимый регресс положительного инотропного эффекта, вызванного ИмС.

Проведенное исследование не обнаружило отрицательного влияния ИмС на изменение работоспособности изолированного сердца крысы. Напротив, выявлена тенденция увеличения работоспособности в первые 5 минут применения ИмС. Достижение максимума и длительность этого эффекта зависит от концентрации ИмС в перфузируемом растворе. При концентрации 170 ЕД/л очевидный прирост эффекта обнаруживается с 10-й минуты, при более высоких концентрациях – с 5-й минуты. Длительность нарастания

return of performance indicators to the baseline values – with the use of ISs at a dose of 170 IU/l at the 30th minute, at a dose of 340 IU/l at the 40th minute. With the use of ISs at doses of 510 and 1020 IU/l, by the 40th minute the effect of increasing of the performance weakens, but the values of the performance indicator are still higher than the baseline ones.

CONCLUSION

The obtained experimental data show that immobilized subtilisins increase the performance of the heart. This circumstance will make it possible to expand the use of the drug Thrombovasim® in conditions of a coronary circulation catastrophe.

Experimental data suggest that in a wide range of doses, Thrombovasim® will not lead to a decrease in myocardial contractility. The study of the pharmacological mechanisms of the cardiotropic effect of immobilized subtilisins should be continued.

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

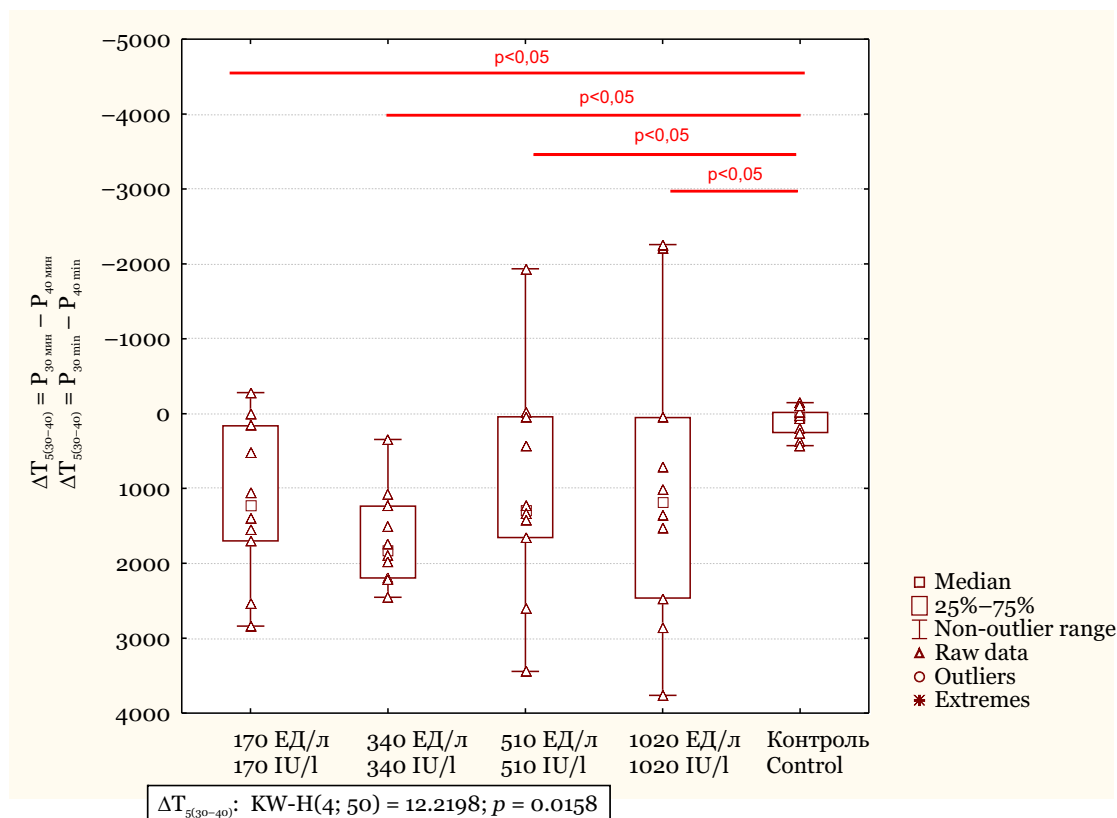


Рис. 9. Прирост работоспособности в опытных и контрольной группах с 30-й по 40-ю минуту перфузии ($\Delta T_{5(30-40)}$)
Fig. 9. The increase of the performance in the experimental and control groups from the 30th to the 40th minute of perfusion ($\Delta T_{5(30-40)}$)

эффекта при применении ИмС в дозах 170–510 ЕД/л сохраняется до 20-й минуты, в дозе 1020 ЕД/л – до 30-й минуты. Затем отмечается возврат показателей работоспособности к исходным значениям – при применении ИмС в дозе 170 ЕД/л на 30-й минуте, в дозе 340 ЕД/л на 40-й минуте. При применении ИмС в дозах 510 и 1020 ЕД/л к 40-й минуте эффект увеличения работоспособности ослабевает, но значения показателя работоспособности все еще выше исходных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные показывают, что иммобилизованные субтилизины

увеличивают работоспособность сердца. Данное обстоятельство позволит расширить применение лекарственного препарата Тромбовазим в условиях катастрофы коронарного кровообращения.

Экспериментальные данные позволяют утверждать, что в широком диапазоне доз Тромбовазим не приведет к уменьшению сократительности миокарда. Изучение фармакологических механизмов кардиотропного влияния иммобилизованных субтилизинов необходимо продолжить.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen // Pflügers. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere. 1895;61:291–332.
2. Bell R.M., Mocanu M.M., Yellon D.M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion // J. Mol. Cell. Cardiol. 2011;50(6):940–950. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.018.
3. Olejnickova V., Novakova M., Provaznik I. Isolated heart models: cardiovascular system studies and

REFERENCES

1. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. Pflügers. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere. 1895;61:291–332.
2. Bell R.M., Mocanu M.M., Yellon D.M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. J. Mol. Cell. Cardiol. 2011;50(6):940–950. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.018.
3. Olejnickova V., Novakova M., Provaznik I. Isolated heart models: cardiovascular system studies and

- technological advances // *Med. Biol. Eng. Comput.* 2015;53(7):669–678. DOI: 10.1007/s11517-015-1270-2.
4. Watanabe M., Okada T. Langendorff perfusion method as an ex vivo model to evaluate heart function in rats // *Methods Mol. Biol.* 2018;1816:107–116. DOI: 10.1007/978-1-4939-8597-5_8.
5. Торопова Я.Г., Мухамадияров Р.А., Головкин А.С. Влияние различных концентраций липосомальной формы эмоксипина на коронарный поток, сократительную и насосную функции изолированного сердца крысы в условиях тотальной нормотермической ишемии и реперфузии // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2013;99(7):869–875.
6. Хисамиева Л.И., Чершинцева Н.Н., Купцова А.М., Зиятдинова Н.И., Зефилов Т.Л. Блокада α 2-адренорецепторов ингибирует работу изолированного по Лангендорфу сердца крысы // *Бюл. эксперимент. биологии и медицины.* 2021;172(9):273–276. DOI: 10.47056/365-9615-2021-172-9-273-276.
7. Байкалов Г.И., Князев Р.А., Ершов К.И. и др. Изучение влияния иммобилизованных субтилизинов на коронарный кровоток в эксперименте на изолированном сердце крысы // *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2021;3:56–65. DOI: 10.31549/2542-1174-2021-3-56-65.
8. Madonov P., Leont'ev S., Zotov S. Initial results of oral thrombolytic agent clinical application // *Proceedings (the 25th Biennial International Congress of Thrombosis).* 2018;2(9):530. DOI: 10.3390/proceedings2090530.
9. Мадонов П.Г., Момот А.П., Мамаев А.Н., Ройтман Е.В., Мишенина С.В. Неплазминовый фибринолиз субтилизинами // *Тромбоз, гемостаз и реология.* 2019;3(79):24–32. DOI: 10.25555/THR.2019.3.0886.
10. Мишенина С.В., Байкалов Г.И., Байкалова Н.Е., Макаров В.К., Мадонов П.Г. Обоснование применения иммобилизованных субтилизинов для таргетной терапии венозных тромбозов // *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2020;1:76–88. DOI: 10.31549/2542-1174-2020-1-76-88.
11. Arifin W.N., Zahiruddin W.M. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach // *Malays J. Med. Sci.* 2017;24(5):101–105. DOI: 10.21315/mjms2017.24.5.11.
- technological advances. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2015;53(7):669–678. DOI: 10.1007/s11517-015-1270-2.
4. Watanabe M., Okada T. Langendorff perfusion method as an ex vivo model to evaluate heart function in rats. *Methods Mol. Biol.* 2018;1816:107–116. DOI: 10.1007/978-1-4939-8597-5_8.
5. Toropova Ya.G., Mukhamadiyarov R.A., Golovkin A.S. Effect of different concentrations the liposomal emoxipin on coronary flow, contractive and pumping functions of the isolated rat heart after normothermic ischemia and reperfusion. *Russian Journal of Physiology,* 2013;99(7):869–875. (In Russ.)
6. Khisamieva L.I., Chershintseva N.N., Kuptsova A.M., Ziyatdinova N.I., Zefirov T.L. The blocked of α 2-adrenergic receptors inhibits the functional parametrs of the Langendorff isolated rat heart. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2021;172(9):273–276. DOI: 10.47056/365-9615-2021-172-9-273-276. (In Russ.)
7. Baikarov G.I., Knyazev R.A., Ershov K.I. et al. Study of the immobilized subtilisins influence on coronary blood flow of an isolated rat heart. *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2021;3:56–65. DOI: 10.31549/2542-1174-2021-3-56-65.
8. Madonov P., Leont'ev S., Zotov S. et al. Initial results of oral thrombolytic agent clinical application. *Proceedings (the 25th Biennial International Congress of Thrombosis).* 2018;2(9):530. DOI: 10.3390/proceedings2090530.
9. Madonov P.G., Momot A.P., Mamaev A.N., Roitman E.V., Mishenina S.V. Non-plasmin fibrinolysis with immobilized subtilisins. *Thromboz, hemostaz and rheologia.* 2019;3(79):24–32. DOI: 10.25555/THR.2019.3.0886. (In Russ.)
10. Mishenina S.V., Baikarov G.I., Baikalova N.E., Makarov V.K., Madonov P.G. A rationale for application of immobilized subtilisins for target therapy of venous thrombosis. *Journal of Siberian Medical Sciences.* 2020;1:76–88. DOI: 10.31549/2542-1174-2020-1-76-88.
11. Arifin W.N., Zahiruddin W.M. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malays J. Med. Sci.* 2017;24(5):101–105. DOI: 10.21315/mjms2017.24.5.11.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Байкалов Герман Игоревич – ординатор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-5445-9920.

Леонов Николай Петрович – старший научный сотрудник лаборатории фармацевтической технологии НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии

ABOUT THE AUTHORS

German I. Baikarov – Resident, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-5445-9920.

Nikolai P. Leonov – Senior Researcher, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-4364-8937.

Pavel G. Madonov – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of Pharmacology, Clinical Phar-

и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-4364-8937.

Мадонов Павел Геннадьевич – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; руководитель отдела экспериментальной фармакологии НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-1093-8938.

Ершов Константин Игоревич – канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; старший научный сотрудник лаборатории фармацевтической технологии НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-4139-036X.

Князев Роман Александрович – канд. биол. наук, ассистент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-2678-8783.

Бахарева Ксения Игоревна – младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-2054-1659.

Солдатова Марина Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории фармакологического моделирования и скрининга биоактивных молекул НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-1050-6921.

macology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Head, Department of Experimental Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1093-8938.

Konstantin I. Ershov – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University; Senior Researcher, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-4139-036X.

Roman A. Knyazev – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-2678-8783.

Ksenia I. Bakhareva – Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-2054-1659.

Marina S. Soldatova – Junior Researcher, Laboratory of Pharmacological Modeling and Screening of Bioactive Molecules, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-1050-6921.