

УДК [615.322:582.26]:616.36-002.17  
<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-2-8-18>

# ВЛИЯНИЕ ФУКОКСАНТИНА НА ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ CCl<sub>4</sub>-ИНДУЦИРОВАННОГО ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

СЛАУТИН В.Н.<sup>1\*</sup>, ГРЕБНЕВ Д.Ю.<sup>1,2</sup>, МАКЛАКОВА И.Ю.<sup>1,2</sup>, САЗОНОВ С.В.<sup>1,2</sup>, ГАВРИЛОВ И.В.<sup>1,2</sup>, ГАВРИЛОВА Е.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup>ГАУЗ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

## Резюме

**Актуальность.** В современной концепции патогенеза фиброза печени ключевым звеном является процесс активации и дифференцировки перисинусоидальных клеток печени Ито в миофибробласты. В первую очередь, этот процесс индуцируется с помощью TGF-β – главного профиброгенного фактора роста. Ингибирование TGF-β-зависимой активации перисинусоидальных клеток печени Ито является перспективной стратегией для подавления процессов фиброгенеза в печени.

**Цель.** Изучение эффективности применения фукоксантина в дозе 30 мг/кг и его влияния на основные звенья патогенеза фиброза печени.

**Материалы и методы.** Эксперименты проведены на 30 аутобредных ICR/CD1 мышьях, распределённых случайным образом на три группы: группу интактных животных, контрольную и экспериментальную группы. Контрольная и экспериментальная группы получали тетрахлорметан (CCl<sub>4</sub>) внутривентриально в дозе 2 мкл/г в течение 6 недель 2 раза в неделю. Животные экспериментальной группы после моделирования CCl<sub>4</sub>-индуцированного фиброза печени получали фукоксантин ежедневно *per os* через зонд в дозе 30 мг/кг в течение 5 недель. Для оценки эффективности лечения фукоксантином выполнено исследование гистологических препаратов с использованием шкалы METAVIR. Для окраски на соединительную ткань был использован краситель

Sirius Red. Иммуногистохимическим методом производился анализ количества α-SMA+ клеток, CD45+ клеток, положительно окрашенных на TIMP-1 областей. Иммуноферментным методом в гомогенате печени проведено определение TGF-β, в сыворотке крови – определение провоспалительных цитокинов – IL-1β, TNF-α. Также в исследовании оценивались биохимические показатели: АЛТ, АСТ, альбумин.

**Результаты.** Применение фукоксантина привело к восстановлению основных биохимических показателей сыворотки крови, снижению количества миофибробластов и уровня TIMP-1 и TGF-β, уменьшению содержания соединительной ткани. В проведенном исследовании показано, что применение фукоксантина привело к снижению уровня провоспалительных цитокинов и количества CD45+ лейкоцитов.

**Заключение.** Установлено, что фукоксантин в дозе 30 мг/кг обладает антифибротическим действием и снижает воспаление при фиброзе печени.

**Ключевые слова:** фукоксантин, фиброз печени, перисинусоидальные клетки печени Ито, миофибробласты.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Источник финансирования

Собственные средства.

## Для цитирования:

Слаутин В.Н., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Сазонов С.В., Гаврилов И.В., Гаврилова Е.И. Влияние фукоксантина на основные механизмы развития CCl<sub>4</sub>-индуцированного фиброза печени. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2023;8(2): 8-18. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-2-8-18>

## \*Корреспонденцию адресовать:

Слаутин Василий Николаевич, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3, E-mail: [slautinvasilij@gmail.ru](mailto:slautinvasilij@gmail.ru)  
© Слаутин В. Н. и др.

## ORIGINAL RESEARCH

# THE EFFECTS OF FUCOXANTHIN ON THE DEVELOPMENT OF CCl<sub>4</sub>-INDUCED LIVER FIBROSIS

VASILIIY N. SLAUTIN<sup>1\*</sup>, DMITRY YU. GREBNEV<sup>1,2</sup>, IRINA YU. MAKLAKOVA<sup>1,2</sup>, SERGEY V. SAZONOV<sup>1,2</sup>, ILYA V. GAVRILOV<sup>1,2</sup>, ELENA I. GAVRILOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

## Abstract

**Background.** According to current concepts regarding hepatic fibrosis, myofibroblast differentiation from stellate cells, regulated by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), is a key step in its pathogenesis. Hence, inhibition of TGF- $\beta$ -dependent activation of hepatic stellate cells has been suggested as a promising strategy for preventing the disease development.

**Aim.** To explore whether the administration of fucoxanthin at a dose of 30 mg/kg is efficient in suppressing hepatic fibrosis.

**Materials and Methods.** The experiments were carried out on 30 outbred ICR/CD1 mice which have been divided into three groups: intact animals, animals with untreated hepatic fibrosis which has been induced by intraperitoneal injections of CCl<sub>4</sub> (2  $\mu$ l/g, 6 weeks, twice per week), and animals which received fucoxanthin *per os* (30 mg/kg daily for 5 weeks) after inducing hepatic fibrosis as described above. Histological examination was performed by Sirius Red staining using the METAVIR fibrosis and activity score. Immunohistochemical analysis was performed by quantitation of  $\alpha$ -SMA-positive myofibroblasts,

CD45-positive leukocytes, and TIMP-1-positive regions. Further, we quantified TGF- $\beta$  in liver homogenate as well as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the serum by means of enzyme-linked immunosorbent assay. An assessment of liver function was conducted by measuring serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and albumin levels.

**Results.** Fucoxanthin decreased the number of myofibroblasts and leukocytes, the volume of connective tissue and TIMP-1-positive regions, and the level of TGF- $\beta$  in the liver homogenate, altogether indicative of ameliorated hepatic fibrosis. In accord, treatment with fucoxanthin reduced serum IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, and increased serum albumin.

**Conclusion.** Treatment with fucoxanthin at a dose of 30 mg/kg has an antifibrotic effect and diminishes liver fibrosis.

**Keywords:** Fucoxanthin, liver fibrosis, hepatic stellate cells, myofibroblasts.

### Conflict of Interest

None declared.

### Funding

There was no funding for this project.

◀ English

### For citation:

Vasiliiy N. Slautin, Dmitry Yu. Grebnev, Irina Yu. Maklakova, Sergey V. Sazonov, Ilya V. Gavrilov, Elena I. Gavrilova. The effect of fucoxanthin on the development of CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis. *Fundamental and Clinical Medicine*. (In Russ.). 2023;8(2): 8-18. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-2-8-18>

### \*Corresponding author:

Dr. Vasiliiy N. Slautin, 3, Repina Street, Yekaterinburg, Russian Federation, E-mail: [slautinvasilij@gmail.ru](mailto:slautinvasilij@gmail.ru)

© Vasiliiy N. Slautin, et al.

## Введение

Известно, что развитие фиброза печени происходит вследствие длительного воздействия различных патологических факторов на печень, включая вирусные гепатиты В и С, токсические, лекарственные, алкогольные воздействия и др. [1]. В соответствии с современной концепцией фиброза печени основным источником профиброгенных миофибробластов, от-

ветственных за развитие фиброза, являются перисинусоидальные клетки печени Ито. По разным оценкам, их вклад в общий пул миофибробластов составляет от 82 до 96% [2].

Миофибробласты ответственны за нарушение физиологического состояния внеклеточного матрикса. Они вырабатывают избыточное количество соединительной ткани, в первую очередь коллагена I типа. Более того, они

синтезируют фермент, тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ-1 (TIMP-1), подавляющий активность других ферментов (матриксных металлопротеиназ), действие которых направлено на разрушение избыточно-синтезированного внеклеточного матрикса [3].

Перисинусоидальные клетки печени Ито способны активироваться в миофибробласты под действием различных факторов роста, цитокинов и активных форм кислорода, выделяемых при повреждении печени. Кроме перисинусоидальных клеток печени Ито, потенциально в миофибробласты способны дифференцироваться порталные фибробласты и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки печени [4, 5].

Ключевым фактором роста, участвующим в процессе активации перисинусоидальных клеток печени Ито, является трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), который реализует своё действие преимущественно через канонический (TGF- $\beta$ /Smad) сигнальный путь [6, 7]. TGF- $\beta$  связывается с рецептором на поверхности клеток (TGF $\beta$ -RI) и передаёт сигнал через систему цитоплазматических белков SMAD, которые транслоцируются в ядро и запускают синтез соединительной ткани и TIMP-1 [8]. Ингибирование данного сигнального пути является перспективным направлением для подавления активации перисинусоидальных клеток печени Ито, подавления процессов фиброгенеза [9].

В недавнем исследовании, проведённом на культуре клеток печени Ито, было установлено, что фукоксантин способен подавлять активацию перисинусоидальных клеток печени Ито через блокирование канонического пути TGF- $\beta$  [10]. Дальнейшие исследования позволили установить влияние фукоксантина на энергетический обмен при активации клеток печени Ито, реализующееся через ингибирование в них митохондриального дыхания [11].

Фукоксантин – вещество, относящееся к группе каротиноидов. Благодаря особенностям химической структуры каротиноиды обладают выраженными антиоксидантными, противовоспалительными, геропротекторными и гепатопротекторными свойствами [12, 13, 14, 15].

## Цель исследования

Изучение возможности и перспективности использования фукоксантина в дозе 30 мг/кг при фиброзе печени.

## Материалы и методы

Для проведения исследования были использованы 30 аутбредных ICR/CD1 самцов мышей в возрасте 8–10 недель (массой 20–22 г). Дизайн исследования был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №11 от 24.12.2021).

В настоящем исследовании лабораторные животные были случайным образом распределены на три группы: группу интактных животных, группу контроля и экспериментальную группу.

Группе интактных животных не производилось моделирование фиброза печени тетрахлорметаном (CCl<sub>4</sub>) и введение фукоксантина.

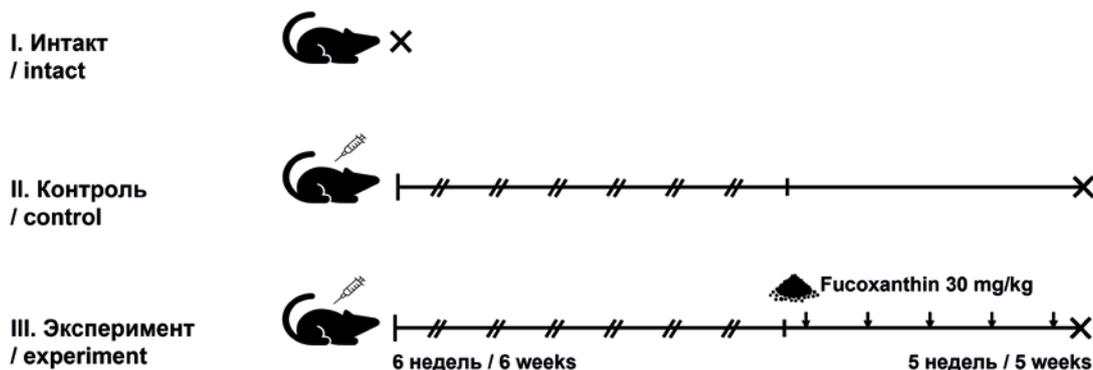
Лабораторные животные группы контроля получали тетрахлорметан (CCl<sub>4</sub>) внутрибрюшинно в дозе 2 мкл/г, в течение 6 недель без последующего введения фукоксантина. Тетрахлорметан был разведён на персиковом масле в соотношении 1:4. Методика моделирования CCl<sub>4</sub>-индуцированного фиброза печени была описана нами ранее [16]. Вывод из эксперимента животных данной группы проводили через 5 недель после последней инъекции.

Животные экспериментальной группы после моделирования фиброза печени тетрахлорметаном, проведённого аналогично группе контроля, получали фукоксантин (Sigma-Aldrich, США) в дозе 30 мг/кг per os через зонд внутрижелудочно в течение 5 недель после прекращения введения CCl<sub>4</sub>. Доза фукоксантина была выбрана на основании исследования, проведённого ранее [17]. Также выбор дозы фукоксантина проведён с учётом данных, представленных в исследованиях по изучению биодоступности и метаболизма фукоксантина [18, 19, 20].

Схема эксперимента представлена на рисунке 1.

Все животные выводились из эксперимента методом цервикальной дислокации.

Для гистологического исследования из левой доли печени были взяты кусочки органа размером 10x10x5 мм, которые фиксировались в 10% растворе нейтрального забуференного формалина («Ретиноиды», Россия), и далее изготавливались гистологические срезы толщиной 3-5 мкм. Была использована стандартная проводка гистологических срезов с использованием гистопротектора Excelsior ES (Thermo Scientific, США).



**Рисунок 1.**  
Дизайн исследования. Группы лабораторных животных.

**Figure 1.**  
Study design. Groups of laboratory animals.

Окраска на содержание коллагена в печени проводилась с использованием набора Picro Sirius Red Stain Kit (Abcam, Великобритания; кат. № ab150681). В каждом гистологическом препарате печени было проанализировано 15 областей площадью по 0,28 мм<sup>2</sup>. Общая распространённость фиброза в печени была выражена в процентах и определена как отношение окрашенной области (соединительная ткань) к общей площади анализируемого препарата. Итоговое значение общей выраженности фиброза определялось как среднее значение ± стандартное отклонение в 15 областях. Для анализа микрофотографий использована морфометрическая программа SIAMS 800 (ООО «Сиамс», Россия).

Для оценки выраженности фиброза печени в гистологических препаратах использовалась шкала METAVIR (meta-analysis of histological activity in viral hepatitis). Микропрепараты от каждого экспериментального животного исследовались с использованием светового микроскопа Axio Scope.A1, объектив микроскопа x20 (Carl Zeiss, Германия) и камеры для микроскопа AxioCam 208 (Carl Zeiss, Германия).

Для оценки биохимических показателей сыворотки крови у всех лабораторных животных, участвующих в эксперименте, производился пункционный забор крови из левого желудочка под общей золетил-ксилазиновой (15+5 мг/кг) анестезией с использованием шприца объемом 2 мл и диаметром иглы 23G с дальнейшим помещением сыворотки в пробирки объемом 1 мл (CAT Serum Clot Activator, Grenier, Австрия, кат. № 450531). После центрифугирования крови (1000 g в течение 15 минут при температуре 4 °C) образцы сыворотки были заморожены при – 40 °C.

Для проведения биохимических исследований использовалась единожды замороженная сыворотка крови. Для оценки CCL<sub>4</sub>-индуцированной дисфункции печени определяли сывороточную активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ). Для оценки белок-синтетической функции определяли уровень альбумина. Определение данных показателей проводилось с использованием автоматического биохимического анализатора Chem Well 2910 (Combi, США).

Для проведения иммуногистохимических исследований гистологических препаратов проводилась их депарафинизация, блокирование эндогенной пероксидазной активности с использованием набора Hydrogen Peroxide Blocking Reagent (Abcam, Великобритания; кат. № ab64218), демаскировка антигена была выполнена путём применения цитратного буфера pH 6,0.

Гистологические препараты инкубировали с первичными кроличьими специфическими антителами к мышши (Abcam, Великобритания) в течение 12 часов при температуре +4 °C:

1. TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, тканевой ингибитор металлопротеиназ-1; Anti-TIMP1 antibody), 1: 500 (Abcam, Великобритания; кат. № ab 216432). Демаскировка антигена выполнена с использованием

2. α-SMA (Alpha-smooth muscle actin, альфа гладкомышечный актин; Recombinant Anti-alpha smooth muscle Actin antibody, clone EPR5368), 1: 1000 (Abcam, Великобритания; кат. № ab124964-100).

Срезы инкубировали с вторичными антителами при комнатной температуре в течение 2 часов (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP), 1: 500), (Abcam,

Великобритания; кат. № ab97051). Для выполнения иммуногистохимических исследований была использована система детекции с субстратом пероксидазы (DAB Substrate Kit, набор для приготовления рабочего раствора диаминобензидина, Abcam, Великобритания; кат. № ab 64238-60). Окраска ядер клеток гистологического препарата была проведена с использованием гематоксилина Майера (Avantor, Нидерланды).

Подсчёт площади положительно окрашенной на TIMP-1 области и  $\alpha$ -SMA положительно-окрашенных клеток производился в 15 областях площадью по 0,28 мм<sup>2</sup> (объектив x20).

Для проведения флюоресцентной иммуногистохимии гистологические препараты инкубировали со специфическими антителами к мышечным CD 45 (CD45R (RA3-6B2) FITC, 1: 100 (Santa Cruz Biotech, США; кат. № sc-19597) в течение 12 часов при температуре +4 °C. Визуализация ядер клеток обеспечивалась применением раствора DAPI / Antifade solution (Millipore, США; кат. № S7113). Гистологические препараты печени анализировались с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope 5, объектив микроскопа x20 (Carl Zeiss, Германия), камеры для микроскопа AxioCam 305 color (Carl Zeiss, Германия). Подсчёт клеток, положительных по CD45, в каждом гистологическом препарате производился в 15 областях площадью по 0,28 мм<sup>2</sup>.

Методом иммуноферментного анализа проводилось определение уровней провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1 $\beta$  (ELISA Kit for interleukin 1 Beta (Cloud-Clone Corp, Китай; кат. № SEA563Mu), фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (Cloud-Clone Corp, Китай; кат. № SEA133Mu) в сыворотке кро-

ви и уровня TGF- $\beta$  в гомогенате печени (Mouse TGF beta 1 ELISA Kit (Abcam, Великобритания; кат. № 119557). Определение данных показателей проводилось с использованием автоматического иммуноферментного и биохимического анализатора Chem Well 2910 (Combi, США).

В настоящем исследовании данные были выражены в виде  $\pm$  SD. Полученные данные были проанализированы с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки, а также Н-теста Краскела-Уоллиса с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (программное обеспечение GraphPad, Ла-Хойя, Калифорния). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Установлено, что использование фукоксантина приводило к регрессу фиброза и снижению количества  $\alpha$ -SMA+ миофибробластов.

Интактные животные не получали тетрахлорметан и не имели признаков развития фиброза печени. Гистологическая картина печени данной группы соответствовала 0 стадии фиброза по шкале METAVIR.

По результатам оценки выраженности фиброза печени у 80% животных контрольной группы установлено наличие третьей стадии по шкале METAVIR, остальные 20% имели вторую стадию фиброза печени.

В экспериментальной группе, животные которой получали фукоксантин, выявлено снижение на 75% количества мышечей, имевших третью стадию фиброза печени по шкале METAVIR, у 80% мышечей выявлен фиброз 2-й стадии (таблица 1).

**Таблица 1.** Мыши с различными стадиями фиброза по шкале METAVIR через 5 недель после моделирования фиброза печени.

**Table 1.** Mice with different stages of fibrosis on the METAVIR scale 5 weeks after modeling liver fibrosis.

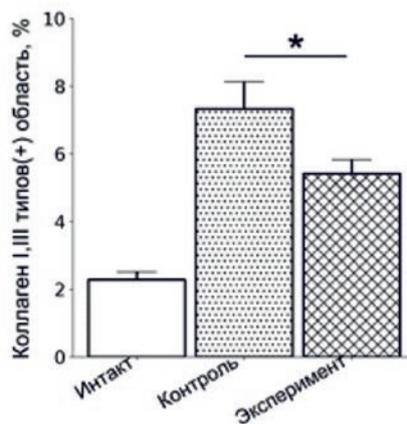
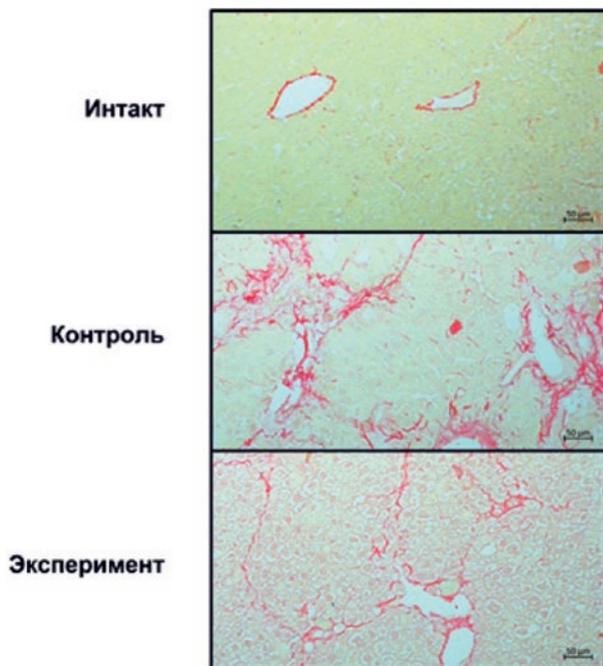
Группа <i>Group</i>	n	Стадии фиброза печени <i>METAVIR fibrosis score</i>					Среднее <i>Average ratio</i>
		0	F1	F2	F3	F4	
Интакт <i>Intact</i>	10	10	0	0	0	0	0 $\pm$ 0 <sup>#</sup>
Контроль <i>Control</i>	10	0	0	2	8	0	2,8 $\pm$ 0,42 <sup>*</sup>
Эксперимент <i>Experiment</i>	10	0	0	8	2	0	2,2 $\pm$ 0,42 <sup>*#</sup>

\* – отличие от группы интактных животных, достоверно с  $p < 0,05$ ; # – отличие от группы контроля, достоверно с  $p < 0,05$ .

\* $p < 0.05$  as compared with intact animals  
# $p < 0.05$  as compared with control animals (not treated with fucoxanthin)

После 6-недельного курса введения тетрахлорметана установлено значительное увеличение площади, окрашенной на коллаген I и III типов, в группе контроля по сравнению с

группой интактных животных. В экспериментальной группе, получавшей фукоксантин, установлено снижение площади окраски на 26,1% по сравнению с группой контроля (рисунок 2).



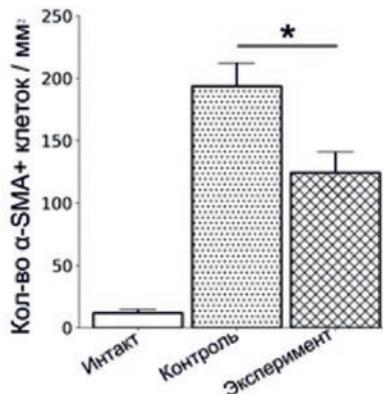
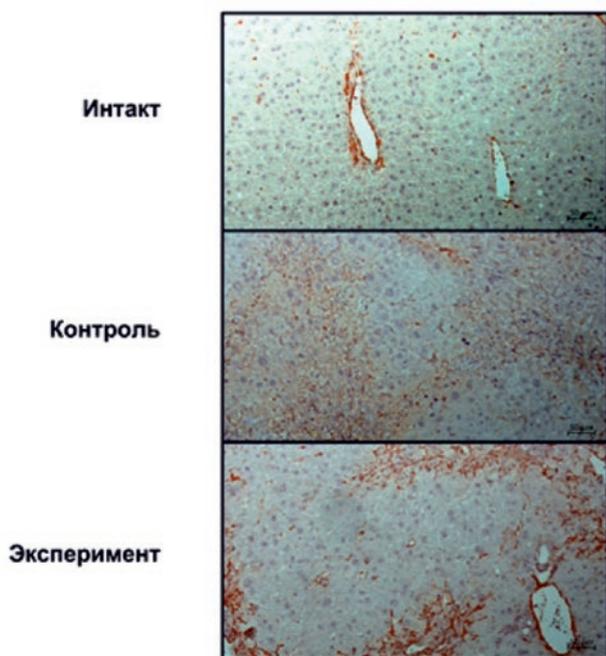
**Рисунок 2.** Изменение площади окрашенной на коллаген I и III типов области. Окраска Sirius red. Объектив x20. \* - отличие от группы контроля, достоверно с  $p < 0,05$ .

**Figure 2.** Reduction of the connective tissue upon the treatment with fucoxanthin. Sirius Red staining, x200 magnification. \* $p < 0.05$  as compared with control animals (not treated with fucoxanthin).

Процесс активации перисинусоидальных клеток печени Ито и дифференцировки их в  $\alpha$ -SMA+ миофибробласты является ключевым звеном в патогенезе фиброза печени [1]. В нашем исследовании проводился подсчет количества  $\alpha$ -SMA+ клеток. Установлено значительное повышение количества  $\alpha$ -SMA+ миофибробластов в группе контроля по сравне-

нию с группой интактных животных ( $p < 0,05$ ). В группе фукоксантина 30 мг/кг количество  $\alpha$ -SMA+ миофибробластов снизилось на 35,8% по сравнению с группой контроля (рисунок 3).

Результаты исследования показали, что применение фукоксантина привело к снижению содержания TGF- $\beta$  и TIMP-1.



**Рисунок 3.** Количество  $\alpha$ -SMA+ миофибробластов на 1 мм<sup>2</sup>. Объектив x20. \* - отличие от группы контроля, достоверно с  $p < 0,05$ .

**Figure 3.** The number of myofibroblasts ( $\alpha$ -SMA+ positive cells) per 1 mm<sup>2</sup>. Anti- $\alpha$ -SMA staining, x200 magnification. \* $p < 0.05$  as compared with control animals (not treated with fucoxanthin).

Трансформирующий фактор роста- $\beta$  является важным профиброгенным фактором роста в развитии фиброза печени, играющим ключевую роль в процессе активации перисинусоидальных клеток печени Ито [9]. Уровень TGF- $\beta$  в группе контроля по сравнению с группой интактных животных значительно вырос ( $p < 0,05$ ). Выявлено снижение уровня TGF- $\beta$  в группе лабораторных животных, получавших фукоксантин в дозе 30 мг/кг на 28,37% (рисунок 5А).

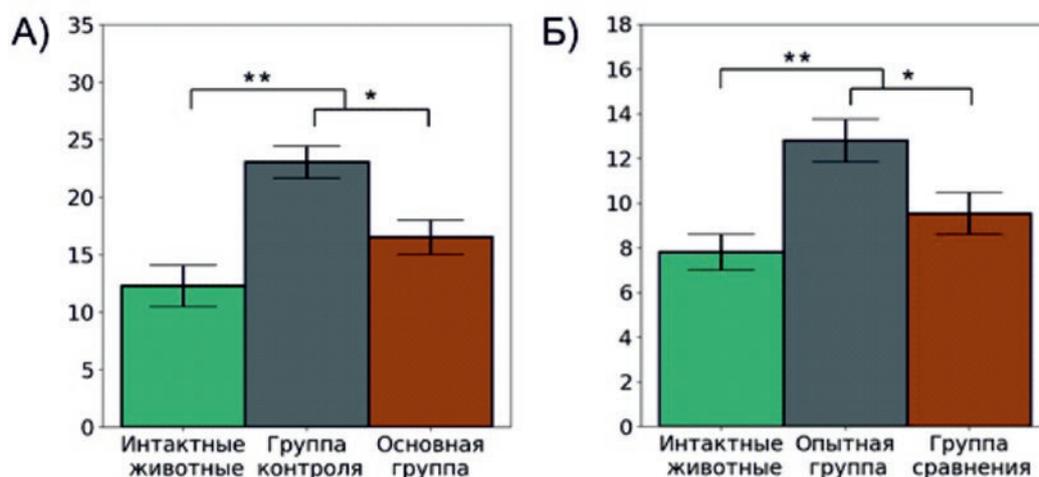
Миофибробласты способны вырабатывать тканевой ингибитор матриксных металлопро-

теиназ-1 (TIMP-1) [3], что приводит к снижению активности антифибротических ферментов – матриксных металлопротеиназ – нарушению физиологического состояния внеклеточного матрикса и смещению равновесия в сторону процессов фиброгенеза. Площадь окрашенной на TIMP-1 области в группе контроля была выше по сравнению с группой интактных животных ( $p < 0,05$ ). Применение фукоксантина привело к снижению площади окраски на 25,45% по сравнению с группой контроля (рисунок 4).

**Рисунок 4.**

Изменение площади, окрашенной на TIMP-1 области в группах лабораторных животных. Объектив  $\times 20$ . \* – отличие от группы контроля, достоверно с  $p < 0,05$ .

**Figure 4.**  
Reduction of TIMP-1-positive area upon the treatment with fucoxanthin. Anti-TIMP-1 staining,  $\times 200$  magnification. \* $p < 0.05$  as compared with control animals (not treated with fucoxanthin).



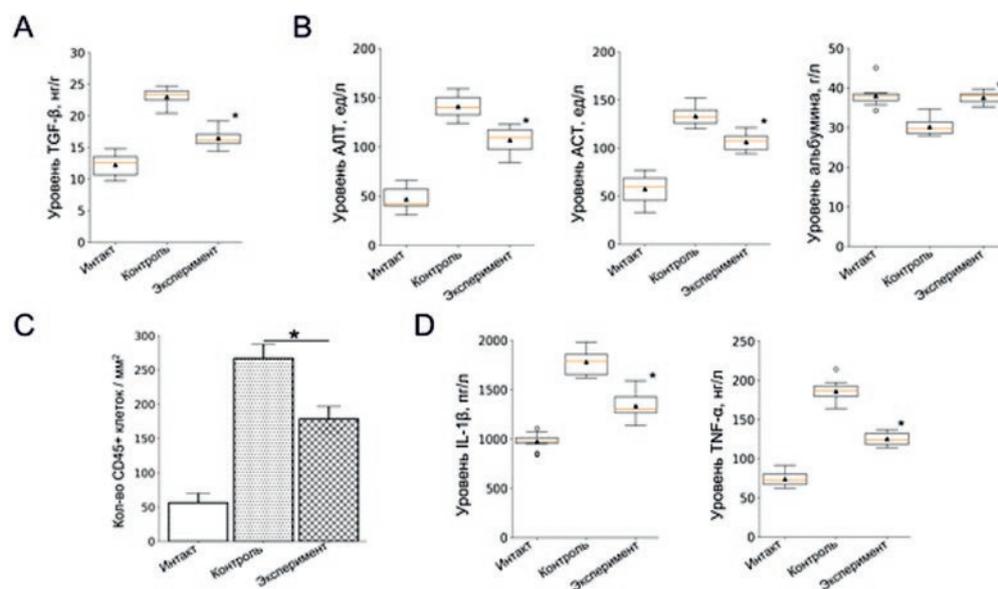
Известно, что фукоксантин подавляет активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и фосфорилирование митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), ответственных за выработку провоспалительных цитокинов, в том числе IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  [13, 21, 23]. В нашем исследовании при анализе данных показателей уровни IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  повышены в группе контроля по сравнению с группой интактных животных ( $p < 0,05$ ). У животных экспериментальной группы снижение уровней IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  составило 25,1% и 32,76% соответственно (рисунок 5D).

Провоспалительные цитокины стимулируют миграцию лейкоцитов в очаг воспаления [21]. Окрашивание гистологических препаратов печени на панлейкоцитарный маркер CD45 выявило повышенное содержание CD45+ клеток в группе контрольных животных, которым вводили тетрахлорметан, в сравнении с интактными животными. Было установлено, что содержание CD45+ клеток значительно увеличилось

в группе контроля по сравнению с группой интактных животных. В экспериментальной группе снижение количества лейкоцитов составило 33,27% по сравнению с группой контроля (рисунок 5С).

АЛТ и АСТ являются биомаркерами повреждения клеток печени. По сравнению с группой интактных животных активность АЛТ и АСТ была значительно выше в группе контроля ( $p < 0,05$ ). При сравнении с группой контроля уровни АЛТ и АСТ в экспериментальной группе снизились на 24% и 20,12% соответственно (рисунок 5В).

При анализе содержания альбумина в сыворотке крови было выявлено снижение данного показателя в группе контроля по сравнению с группой интактных животных ( $p < 0,05$ ). В группе лабораторных животных, получавших фукоксантин в дозе 30 мг/кг, было установлено повышение уровня альбумина на 24,42% и достижение значений уровня альбумина контрольной группы (рисунок 5В).



**Рисунок 5.** Уровень TGF- $\beta$  в гомогенате печени (A); биохимические показатели (АЛТ, АСТ, альбумин) в сыворотке крови мышей (B); количество лейкоцитов (CD45+ клеток) на 1 мм<sup>2</sup> (C); уровень провоспалительных цитокинов, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , в сыворотке крови мышей (D). \* – отличие от группы контроля, достоверно с  $p < 0,05$ .

**Figure 5.** Measurement of biomarkers of hepatic fibrosis in intact mice and animals suffering from CCL4-induced hepatic fibrosis with or without fucoxanthin treatment. (A) the level of TGF- $\beta$  in liver homogenate; (B) the levels of serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and albumin; (C) the number of CD45+ cells per 1 mm<sup>2</sup>; (D) the level of serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . \* $p < 0.05$  as compared with control animals (not treated with fucoxanthin).

## Обсуждение

Известно, что вещества из группы каротиноидов обладают выраженными антиоксидантными, противовоспалительными, гепатопротекторными свойствами, что позволяет предположить их потенциальную эффективность при фиброзе печени [25]. В настоящем исследовании мы изучали возможность применения и механизмы антифибротического действия фукоксантина при фиброзе печени.

На модели CCL<sub>4</sub>-индуцированного фиброза печени у мышей была установлена эффективность использования фукоксантина в дозе 30 мг/кг, что подтверждается восстановлением биохимических показателей сыворотки крови (АЛТ, АСТ, альбумин), уменьшением выраженности фиброза печени по шкале METAVIR, а также снижением содержания соединительной ткани. Интересно, что при применении фукоксантина в малых дозах на модели ассоциированного с диетой ожирения антифибротического действия фукоксантина выявлено не было [26]. Таким образом, можно сделать вывод о дозозависимом антифибротическом действии фукоксантина.

Активация и дифференцировка фибробластов в миофибробласты играет важную роль в заживлении ран, однако неконтролируемое течение этих процессов приводит к патологической фиброзной реакции и нарушению функции органа [3]. Перисинусоидальные клетки печени Ито являются основным источником миофибробластов при токсическом повреждении печени. Они могут быть активированы различными химическими сигналами, в том

числе с помощью активных форм кислорода, провоспалительных цитокинов, факторов роста, выделяемых из повреждённой печени [5]. Миофибробласты характеризуются экспрессией внутриклеточных филаментов ( $\alpha$ -гладкомышечный актин, виментин), а также высокой сократительной способностью [27]. Миофибробласты являются основным источником внеклеточного матрикса при фиброзе печени, а также являются основным продуцентом тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1, способного подавлять процессы фибролиза [3]. Таким образом, уменьшение количества миофибробластов сопровождается снижением активности процессов фиброгенеза. Установлено, что применение фукоксантина значительно снижает количество  $\alpha$ -SMA+ миофибробластов, а также уровень тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1.

В развитие и прогрессирование фиброза печени вовлечены различные факторы. Известно, что TGF- $\beta$  – один из наиболее мощных профиброгенных цитокинов – играет решающую роль в его патогенезе, реализуя своё действие через цитоплазматический комплекс SMAD белков [7]. В более ранних работах *in vitro* на культуре звёздчатых клеток печени была показана способность фукоксантина ингибировать TGF- $\beta$ /SMAD сигнальный путь [10]. Кроме того, при фиброзе печени основным источником TGF- $\beta$  являются активированные перисинусоидальные клетки печени Ито. По результатам данного исследования, применение фукоксантина приводило к снижению уровня TGF- $\beta$ .

Провоспалительные цитокины активно участвуют в развитии фиброза печени. Они стимулируют активацию и дифференцировку перисинусоидальных клеток печени Ито, индуцируют воспаление в очаге повреждения и миграцию лейкоцитов [24]. Известно, что фукоксантин обладает выраженным противовоспалительным действием, реализующимся через подавление ядерного транскрипционного фактора NF-κB и подавление процессов фосфорилирования митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) [22]. По данным, полученным в нашем исследовании, фукоксантин снижал уровни провоспалительных цитокинов и, как следствие, количество CD45<sup>+</sup> лейкоцитов в печени. В исследовании, проведенном японскими учёными, также продемонстрирована способность фукоксантина оказывать противовоспалительное действие при моделировании

стеатогепатита через ингибирование окислительного стресса [28].

## Заключение

В настоящем исследовании, проведенном на модели CCL<sub>4</sub>-индуцированного фиброза печени у мышей, было впервые установлено, что фукоксантин обладает антифибротическим действием, которое реализуется через ингибирование процессов активации и дифференцировки перисинусоидальных клеток печени Ито в миофибробласты. Противовоспалительное действие фукоксантина также способствует подавлению процессов фиброгенеза. Таким образом, результаты нашего исследования демонстрируют, что использование фукоксантина в дозе 30 мг/кг является перспективным и направлено на ингибирование основных механизмов развития фиброза печени.

## Литература :

1. Tan Z., Sun H., Xue T., Gan C., Liu H., Xie Y., Yao Y., Ye T. Liver Fibrosis: Therapeutic Targets and Advances in Drug Therapy. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:730176. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.730176>
2. Cai X., Wang J., Wang J., Zhou Q., Yang B., He Q., Weng Q. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: New insights into therapy. *Pharmacol. Res.* 2020;155:104720. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104720>
3. Pakshir P., Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol.* 2018;68-69:81-93. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.019>
4. Lemoine S., Cadoret A., El Mourabit H., Thabut D., Housset C. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1832(7):948-954. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.02.019>
5. Puche J.E., Saiman Y., Friedman S.L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr. Physiol.* 2013;3(4):1473-1492. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120035>
6. Barnes J.L., Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int.* 2011;79(9):944-956. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.516>
7. Pohlert D., Brenmoehl J., Löffler I., Müller C.K., Leipner C., Schultze-Mosgau S., Stallmach A., Kinne R.W., Wolf G. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1792(8):746-756. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.06.004>
8. Hu H.H., Chen D.Q., Wang Y.N., Feng Y.L., Cao G., Vaziri N.D., Zhao Y.Y. New insights into TGF-β/Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem. Biol. Interact.* 2018;292:76-83. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.008>
9. Xu F., Liu C., Zhou D., Zhang L. TGF-β/SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *J. Histochem. Cytochem.* 2016;64(3):157-167. <https://doi.org/10.1369/0022155415627681>
10. Ong C.H., Tham C.L., Harith H.H., Firdaus N., Israf D.A. TGF-β-induced fibrosis: A review on the underlying mechanism and potential therapeutic strategies. *Eur. J. Pharmacol.* 2021;911:174510. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174510>
11. Kim M.B., Bae M., Hu S., Kang H., Park Y.K., Lee J.Y. Fucoxanthin exerts anti-fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019;513(3):657-662. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.052>
12. Bonet M.L., Canas J.A., Ribot J., Palou A. Carotenoids and their conversion products in the control of adipocyte function, adiposity and obesity. *Arch. Biochem. Biophys.* 2015;572:112-125. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.02.022>
13. Liu M., Li W., Chen Y., Wan X., Wang J. Fucoxanthin: A promising compound for human inflammation-related diseases. *Life Sci.* 2020;255:117850. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117850>
14. Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Титова Д.И., Пермьяков Н.С. Геропротекторные свойства фукоксантина. *Уральский медицинский журнал.* 2022;21(5):94-101. <https://doi.org/10.52420/2071-5943-2022-21-5-94-101>
15. Гребнев Д.Ю., Слаутин В.Н., Маклакова И.Ю., Береснева О.Ю., Конышев К.Ю. Механизмы антифибротического действия плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Вестник уральской медицинской академической науки.* 2022;19(4):355-364. <https://doi.org/10.22138/2500-0918-2022-19-4-355-36416>
16. Sangeetha R.K., Bhaskar N., Divakar S., Baskaran V. Bioavailability and metabolism of fucoxanthin in rats: structural characterization of metabolites by LC-MS (APCI). *Mol. Cell. Biochem.* 2010;333(1-2):299-310. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0231-1>
17. Kim K.N., Heo S.J., Yoon W.J., Kang S.M., Ahn G., Yi T.H., Jeon Y.J. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-κB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 2010;649(1-3):369-375. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.032>
18. Goodman Z.D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J. Hepatol.* 2007;47(4):598-607. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.006>
19. Shiratori K., Ohgami K., Ilieva I., Jin X.H., Koyama Y., Miyashita K., Yoshida K., Kase S., Ohno S. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Exp. Eye Res.* 2005;81(4):422-428. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.03.002>
20. Tan C.P., Hou Y.H. First evidence for the anti-inflammatory activity of fucoxanthin in high-fat-diet-induced obesity in mice and the antioxidant functions in PC12 cells. *Inflammation.* 2014;37(2):443-450. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9757-1>
21. Meier R.P.H., Meyer J., Montanari E., Lacotte S., Balaphas A., Muller Y.D., Clément S., Negro F., Toso C., Morel P., Buhler L.H. Interleukin-1 Receptor Antagonist Modulates Liver Inflammation and Fibrosis in Mice in a Model-Dependent Manner. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(6):1295. <https://doi.org/10.3390/ijms20061295>
22. Bae M., Kim M.B., Park Y.K., Lee J.Y. Health benefits of fucoxanthin

in the prevention of chronic diseases. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids.* 2020;1865(11):158618. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158618>

23. Kisseleva T., Brenner A. Inactivation of myofibroblasts during regression of liver fibrosis. *Cell Cycle.* 2013;12(3):381-382. <https://doi.org/10.4161/cc.23549>

## References:

- Tan Z, Sun H, Xue T, Gan C, Liu H, Xie Y, Yao Y, Ye T. Liver Fibrosis: Therapeutic Targets and Advances in Drug Therapy. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:730176. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.730176>
- Cai X, Wang J, Wang J, Zhou Q, Yang B, He Q, Weng Q. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: New insights into therapy. *Pharmacol Res.* 2020;155:104720. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104720>
- Pakshir P, Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol.* 2018;68-69:81-93. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.019>
- Lemoine S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1832(7):948-954. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2013.02.019>
- Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol.* 2013;3(4):1473-1492. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120035>
- Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int.* 2011;79(9):944-956. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.516>
- Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(8):746-756. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2009.06.004>
- Hu HH, Chen DQ, Wang YN, Feng YL, Cao G, Vaziri ND, Zhao YY. New insights into TGF-β/Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact.* 2018;292:76-83. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.008>
- Xu F, Liu C, Zhou D, Zhang L. TGF-β/SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *J Histochem Cytochem.* 2016;64(3):157-167. <https://doi.org/10.1369/0022155415627681>
- Ong CH, Tham CL, Harith HH, Firdaus N, Israf DA. TGF-β-induced fibrosis: A review on the underlying mechanism and potential therapeutic strategies. *Eur J Pharmacol.* 2021;911:17451 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174510>
- Kim MB, Bae M, Hu S, Kang H, Park YK, Lee JY. Fucoxanthin exerts anti-fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;513(3):657-662. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.052>
- Bonet ML, Canas JA, Ribot J, Palou A. Carotenoids and their conversion products in the control of adipocyte function, adiposity and obesity. *Arch Biochem Biophys.* 2015;572:112-125. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.02.022>
- Liu M, Li W, Chen Y, Wan X, Wang J. Fucoxanthin: A promising compound for human inflammation-related diseases. *Life Sci.* 2020;255:117850. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117850>
- Grebnev DYU, Maklakova IYu, Titova DI, Permyakov NS. Geroprotective properties of fucoxanthin. *Ural Medical Journal.* 2022;21(5):94-101. (In Russ). <https://doi.org/10.52420/2071-5943-2022-21-5-94-101>
- Grebnev DJu, Slautin VN, Maklakova IJu, Beresneva OY, Konyshov KY. Mechanisms of antifibrotic action of placental multipotent mesenchymal stromal cells. *Vestn Ural Med Akad Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science.* 2022;19(4):355-364. (In Russ). <https://doi.org/10.22138/2500-0918-2022-19-4-355-364>
- Sangeetha RK, Bhaskar N, Divakar S, Baskaran V. Bioavailability and metabolism of fucoxanthin in rats: structural characterization of metabolites by LC-MS (APCI). *Mol Cell Biochem.* 2010;333(1-2):299-310. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0231-1>
- Kim KN, Heo SJ, Yoon WJ, Kang SM, Ahn G, Yi TH, Jeon YJ. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-κB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur J Pharmacol.* 2010;649(1-3):369-375. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.032>
- Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 2007;47(4):598-607. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.006>
- Shiratori K, Ohgami K, Ilieva I, Jin XH, Koyama Y, Miyashita K, Yoshida K, Kase S, Ohno S. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Exp Eye Res.* 2005;81(4):422-428. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.03.002>
- Tan CP, Hou YH. First evidence for the anti-inflammatory activity of fucoxanthin in high-fat-diet-induced obesity in mice and the antioxidant functions in PC12 cells. *Inflammation.* 2014;37(2):443-450. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9757-1>
- Meier RPH, Meyer J, Montanari E, Lacotte S, Balaphas A, Muller YD, Clément S, Negro F, Toso C, Morel P, Buhler LH. Interleukin-1 Receptor Antagonist Modulates Liver Inflammation and Fibrosis in Mice in a Model-Dependent Manner. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1295. <https://doi.org/10.3390/ijms20061295>
- Bae M, Kim MB, Park YK, Lee JY. Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(11):158618. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158618>
- Kisseleva T, Brenner DA. Inactivation of myofibroblasts during regression of liver fibrosis. *Cell Cycle.* 2013;12(3):381-382. <https://doi.org/10.4161/cc.23549>

## Сведения об авторах

**Слаутин Василий Николаевич**, аспирант кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3).

**Вклад в статью:** проведение исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, составление текста статьи, подготовка графических элементов и иллюстрационных материалов.

**ORCID:** 0000-0003-3967-0442

**Гребнев Дмитрий Юрьевич**, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3); старший научный сотрудник ГАУЗ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий» (620026, Россия, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22а).

**Вклад в статью:** концепция и дизайн исследования, проведение исследования, сбор данных, критический пересмотр статьи на предмет важного интеллектуального содержания, утверждение окончательного варианта статьи.

**ORCID:** 0000-0002-5698-8404

## Authors

**Dr. Vasily N. Slautin**, PhD Student, Department of Pathophysiology, Ural State Medical University (3, Repina Street, Yekaterinburg, 362028, Russian Federation).

**Contribution:** conceived and designed the study; collected and analysed the data; performed the experiments; prepared the figures; wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0003-3967-0442

**Dr. Dmitry Yu. Grebnev**, MD, DSc, Head of the Department of Pathophysiology, Ural State Medical University (3, Repina Street, Yekaterinburg, 362028, Russian Federation); Senior Research Fellow, Institute of Medical Cell Technologies (22a, Karl Marx Street, Yekaterinburg, 620026, Russian Federation).

**Contribution:** conceived and designed the study; collected and analysed the data; performed the experiments; wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0002-5698-8404

**Dr. Irina Yu. Maklakova**, MD, DSc, Head of the Department of Normal Physiology, Ural State Medical University (3, Repina Street,

**Маклакова Ирина Юрьевна**, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3); старший научный сотрудник ГАОУ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий» (620026, Россия, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22а).

**Вклад в статью:** концепция и дизайн исследования, критический пересмотр статьи на предмет важного интеллектуального содержания.

**ORCID:** 0000-0002-6895-7947

**Сазонов Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3); заместитель главного врача по науке ГАОУ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий» (620026, Россия, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22а).

**Вклад в статью:** критический пересмотр статьи на предмет важного интеллектуального содержания, утверждение окончательного варианта статьи.

**ORCID:** 0000-0001-7064-0079

**Гаврилов Илья Валерьевич**, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры биохимии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3); научный сотрудник ГАОУ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий» (620026, Россия, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22а).

**Вклад в статью:** проведение биохимических исследований, критический пересмотр статьи на предмет важного интеллектуального содержания.

**ORCID:** 0000-0003-0806-1177

**Гаврилова Елена Игоревна**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3).

**Вклад в статью:** критический пересмотр статьи на предмет важного интеллектуального содержания.

**ORCID:** 0000-0003-4680-9254

Yekaterinburg, 362028, Russian Federation); Senior Research Fellow, Institute of Medical Cell Technologies (22a, Karl Marx Street, Yekaterinburg, 620026, Russian Federation).

**Contribution:** conceived and designed the study; wrote the manuscript.  
**ORCID:** 0000-0002-6895-7947

**Dr. Sergey V. Sazonov, MD, DSc**, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Ural State Medical University (3, Repina Street, Yekaterinburg, 362028, Russian Federation); Chief Scientific Officer, Institute of Medical Cell Technologies (22a, Karl Marx Street, Yekaterinburg, 620026, Russian Federation).

**Contribution:** wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0001-7064-0079

**Dr. Ilya V. Gavrilov, MD, PhD**, Associate Professor, Department of Biochemistry, Ural State Medical University (3, Repina Street, Yekaterinburg, 362028, Russian Federation).

**Contribution:** performed the experiments.

**ORCID:** 0000-0003-0806-1177

**Dr. Elena I. Gavrilova, MD, PhD**, Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Ural State Medical University (3, Repina Street, Yekaterinburg, 362028, Russian Federation).

**Contribution:** wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0003-4680-9254

Статья поступила: 03.02.2023 г.

Принята в печать: 30.05.2023 г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 03.02.2023

Accepted: 30.05.2023

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.