



DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-6

УДК 616-099:543.393

# Состояние глутатионового звена антиоксидантной защиты организма при фунгицидной интоксикации и коррекции витамином А и расторопшей

В.А. Королев , А.В. Седых , Ю.Э. Азарова , Е.В. Фелькер ,  
Л.А. Ячmeneва , И.В. Королев , Е.В. Королев

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Курский государственный медицинский университет»,  
ул. Карла Маркса, д. 3, г. Курск, 305041, Российская Федерация

Авторы для переписки: В.А. Королев ([medecol1@yandex.ru](mailto:medecol1@yandex.ru)), А.В. Седых ([turquoise95@mail.ru](mailto:turquoise95@mail.ru))








## Резюме

**Актуальность:** Поступление тирама с пищевой продукцией в ткани, органы животных и человека может приводить к активации процессов свободнорадикального окисления и, как следствие, дисбалансу функционирования системы антиоксидантной защиты организма. **Цель исследования:** Определение состояния глутатионового звена антиоксидантной защиты организма при фунгицидной интоксикации и коррекции витамином А и расторопшей. **Материалы и методы:** Проведена субхроническая интоксикация тирамом в дозе 1/50 LD50 (1,6 мг) на протяжении 4 недель при воздействии *in vivo* на организм 240 крыс линии Вистар в возрасте 2 мес. Исследовано влияние тирама на показатели антиоксидантной защиты организма, на примере вариабельности каталитической активности глутатионпероксидазы (GPX), глутатионредуктазы (GSR), количественного содержания активных форм кислорода (ROS) и подфракций глутатиона (GSH/GSSG). **Результаты:** Моделирование субхронической интоксикации сопровождалось значимым увеличением содержания ROS, повышением активности GPX, GSR ( $p < 0,05$ ). В тоже время отмечается значительное снижение соотношения GSH/GSSG в плазме крови и ротовой жидкости крыс в сравнении с группой контроля. После проведения экспериментальной субхронической интоксикации были использованы антиоксиданты – витамин А (ретинола ацетат) и расторопша. Их применение в течение 30 суток привело к восстановлению уровня исследуемых показателей. **Заключение:** Таким образом, нами показано, что усиление образования свободных радикалов и дисбаланс в функционировании глутатионового пула антиоксидантной защиты происходит вследствие поступления в организм микроколичеств фунгицида тирам. Использование витамина А и расторопши способствует восстановлению прооксидантно-антиоксидантного баланса организма. Полученные результаты могут быть использованы при проведении антиоксидантной терапии для купирования процессов окислительного стресса при пестицидных интоксикациях.

**Ключевые слова:** тирам; глутатион; глутатионредуктаза; глутатионпероксидаза; ROS; витамин А; расторопша

**Для цитирования:** Королев ВА, Седых АВ, Азарова ЮЭ, и др. Состояние глутатионного звена антиоксидантной защиты организма при фунгицидной интоксикации и коррекции витамином А и расторопшей. Научные результаты биомедицинских исследований. 2022;8(2): 207-220. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-6

## Status of the glutathione antioxidant defense in fungicide intoxication and correction with vitamin A and milk thistle

Vladimir A. Korolev , Anastasia V. Sedykh , Yulia E. Azarova ,  
Elena V. Felker , Lilia A. Yachmeneva , Ivan V. Korolev ,  
Egor V. Korolev 

Kursk State Medical University,  
3 Karl Marx St., Kursk, 305041, Russia

*Corresponding authors: Vladimir A. Korolev (medecol1@yandex.ru),  
Anastasia V. Sedykh (turquoise95@mail.ru)*

### Abstract

**Background:** Thiram entering with food products into tissues and organs of animals and humans can lead to the activation of free-radical oxidation processes and, as a consequence, imbalance in the functioning of the antioxidant defense system of the body. **The aim of the study:** Determination of the state of the glutathione unit of the antioxidant defense of the body during fungicidal intoxication and correction with vitamin A and milk thistle. **Materials and methods:** Subchronic intoxication with thiram at a dose of 1/50 LD<sub>50</sub> (1.6 mg) was carried out for 4 weeks under in vivo exposure to 240 Wistar rats at the age of 2 months. The effect of thiram on the indicators of the antioxidant defense of the body was studied using the example of the variability of the catalytic activity of glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GSR), the quantitative content of reactive oxygen species (ROS) and glutathione subfractions (GSH/GSSG). **Results:** In this publication, the effect of thiram intoxication on the antioxidant defense parameters on the body of white Wistar rats' antioxidant defense parameters using the sample of the variability of the catalytic activity of glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GSR), the quantitative content of reactive oxygen species (ROS) and glutathione subfractions (GSH/GSSG). The modeling of subchronic intoxication was accompanied by a significant increase in the content of ROS, an increase in the activity of GPX, GSR ( $p < 0.05$ ). At the same time there is a significant decrease in the GSH/GSSG ratio in the blood plasma and oral fluid of rats in comparison with the control group. After the experimental subchronic intoxication some antioxidants were used, such as vitamin A (retinol acetate) and milk thistle. Their usage for 30 days has led to the restoration of the studied parameters. **Conclusion:** Thus, we have shown that an increase in the formation of free radicals and an imbalance in the functioning of the glutathione pool of antioxidant protection occurs due to the intake of micro-amounts of the fungicide thiram into the body. The use of vitamin A and milk thistle helps to restore the prooxidant-antioxidant balance of the body. The results obtained can be used in antioxidant therapy to stop the processes of oxidative stress in pesticide intoxication.

**Keywords:** thiram; glutathione; glutathione reductase; glutathione peroxidase; ROS; vitamin A; milk thistle

**For citation:** Korolev VA, Sedykh AV, Azarova YuE, et al. Status of the glutathione antioxidant defense in fungicide intoxication and correction with vitamin A and milk thistle. Research Results in Biomedicine. 2022;8(2): 207-220. Russian. DOI:10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-6

**Введение.** В настоящее время широкое применение в агропромышленном комплексе (АПК) получил пестицидный препарат тирам (тетраметилтиурамдисульфид, ТМДТ), который является фунгицидом контактного действия, II класса опасности [1]. Несмотря на высокую экономическую эффективность применения, данный препарат имеет высокие кумулятивные, токсические свойства и способен сохраняться в продуктах переработки агрокультур до полутора лет, в связи с чем представляет экологическую опасность [2, 3]. Поступление тирама в ткани, органы животных и человека приводит к активации процессов свободнорадикального окисления и как следствие, к образованию свободных радикалов (СР) в том числе в виде реактивных форм кислорода (ROS) [4, 5]. Возникновение окислительного стресса происходит в том случае, когда скорость образования активных форм кислорода превышает способность клетки к детоксикации [6]. Ключевым звеном антиоксидантной защиты (АОЗ) организма является система глутатиона, которая включает в себя глутатион и ферменты его метаболизма [7]. Внутриклеточный глутатион представлен в виде 2 форм: восстановленной (GSH), которая синтезируется в цитоплазме клетки, и окисленной (GSSG) [8, 9]. GSH служит низкомолекулярным антиоксидантом. Окисленный глутатион в норме должен поддерживаться на низком уровне. За поддержание высокого соотношения GSH/GSSG, а также защиту клеток от активных форм кислорода (АФК) отвечает глутатионредуктаза (GSR) и глутатионпероксидаза (GPx). Активность GSR регулирует редокс-гомеостаз клетки, функционирование редокс-зависимых белков и защиту клеток от активных форм кислорода (АФК), таких как  $H_2O_2$ ,  $O^-$  и  $^{\bullet}OH$  [10, 11]. GPx инактивирует суперрадикалы и восстанавливает их в органические гидро-

перекиси. Однако, влияние тирама на изменение состояния глутатионового звена антиоксидантной защиты организма не до конца изучено [12].

С учетом высокого удельного веса экопатологий в структуре общей заболеваемости необходима разработка методов коррекции антиоксидантного статуса с помощью антиоксидантной терапии [13, 14]. Для торможения процессов окислительного стресса и нейтрализации свободных радикалов перспективным является применение витамина А (ретинола ацетат) и экстракта расторопши [15, 16].

В настоящей работе представлены биохимические исследования плазмы крови и ротовой жидкости крыс, подвергшихся интоксикации фунгицидным препаратом тирам, а также коррекции витамином А и расторопшей.

**Материалы и методы исследования.** Исследование проводилось на 240 крысах-самцах линии Вистар массой 200-220 грамм. В эксперименте животные были разделены на 8 групп. 1 группа - здоровые, интактные крысы, которые являлись биологическим контролем. 2, 3, 4 и 5 группы получали тирам вместе с гранулированным кормом в дозе 1,6 мг, что является  $1/50 LD_{50}$ , в течение 28 дней. Гранулы комбикорма измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния, добавляли 2 мл дистиллированной воды и взвешенный тирам, формировали гранулы и сушили на открытом воздухе в течение 12 часов. Таким образом, интоксикация достигалась путем естественного кормления исключая физиологический стресс при проведении эксперимента. Забор образцов проводился на 7, 14, 21 и 28 сутки, после декапитации под эфирным наркозом. Шестая группа после 28 дней интоксикации тирамом 30 дней получали обычную еду, согласно их стандартного рациона. В седьмой группе моделировалась субхроническая ин-

токсикация на протяжении 28 суток, с последующим применением антиоксиданта – витамина А в течение 30 суток. В перерасчете на 1 кг веса человека необходимо 0,020 мг/кг препарата. Коэффициент пересчета дозы с отдельного животного на человека составляет – 39,0. Для крысы массой 200 грамм коэффициент пересчета составляет 6,5. Следовательно, расчетная терапевтическая доза витамина А для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составляет:  $(0,020 \cdot 39) / 6,5 = 0,12 \text{ мг/кг} \cdot 0,2 = 0,024 \text{ мг}$ . В группе восемь проводилась субхроническая интоксикация в течение 28 суток, с последующим использованием антиоксиданта – расторопши, на протяжении 30 суток. В перерасчете на 1 кг веса человека необходимо 2,29 мг/кг препарата. Расчетная терапевтическая доза расторопши для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составляет:  $(2,29 \cdot 39) / 6,5 = 13,74 \text{ мг/кг} \cdot 0,2 = 2,75 \text{ мг}$ .

Расчет дозы препарата тирам выполнялся исходя из токсикологических данных: LD50 для крыс составляет 400 мг/кг [17]. В связи с тем, что в эксперименте использовались дозы 1/50 LD50, то после расчета доза для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составила:  $400 \text{ мг/кг} / 50 = 8 \text{ мг/кг} \cdot 0,2 = 1,6 \text{ мг}$  [18].

Сроки забора биожидкостей были выбраны для оценки изменений антиоксидантного статуса при острой, подострой и субхронической интоксикации для анализа динамики изменений и компенсаторных возможностей организма.

Исследования проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986).

Для проведения анализа плазмы крови в течение 30 мин после забора центрифугировали кровь 15 мин на 3000 об/мин при 4°C. Производили забор надосадочной жидкости в микроцентрифужные пробирки в объеме 50 мкл.

Нестимулированная ротовая жидкость была получена путем её забора с помощью микропипетки в чистую пробирку, которую центрифугировали 20 минут на 1500 об/мин. Ротовую жидкость забирали и помещали в микроцентрифужные пробирки, в объеме 50 мкл.

Материалом исследования явилась ротовая жидкость и плазма крови.

После забора и пробоподготовки биобъектов было проведено лабораторное исследование, включающее определение функциональной активности антиоксидантной системы по следующим показателям: глутатион окисленный, глутатион восстановленный, глутатионредуктаза и глутатионпероксидаза, ROS. Для исследования использовались следующие наборы: Catalase Assay Kit, 707002, 96 тестов (Cayman Chemical, USA); Superoxide Dismutases Assay Kit, 706002, 96 тестов (Cayman Chemical, USA); Glutathione Reductase Assay, STA-812, 100 тестов (Cell Biolabs, USA); Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit, K762, 100 тестов (BioVision, USA); OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Green Fluorescence), STA-347, 96 assays (Cell Biolabs, USA); CEA294Ge ELISA Kit for Glutathione (GSH) (Cloud-Clone Corp., USA) и CEK518Ge ELISA Kit for Oxidized Glutathione (GSSG) (Cloud-Clone Corp., USA), Helicon (Москва). Для проведения интоксикации использовали тирам (137-26-8) чистотой 97% (Sigma-Aldrich, USA). Для проведения коррекции использовали витамин А (ретинол ацетат) (Химпитекторг Групп, Россия) и расторопшу (Грин Сайд, Россия).

*Определение глутатиона восстановленного*

Исследование основано на конкурентном методе иммуноферментного анализа (ИФА). В наборе для исследования использовался микропланшет, сорбированный моноклональными антителами специфичными к GSH. Между GSH, меченным биотином, немеченым GSH (содержащимся в образцах и контроле) и сорбированными



антителами специфичными к GSH происходит конкурентная реакция в процессе инкубирования в течение 30 мин при температуре 37° С. Несвязавшийся конъюгат удаляли отмывкой. Затем авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (Horseradish peroxidase, HRP) добавляли в каждую лунку планшета и проводили инкубацию в течение 10 мин при температуре 37° С. Далее тщательно удаляли следы жидкости из планшета и отправляли его в микропланшетный ридер Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA), в котором проводили исследование при длине волны 450 нм. Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации GSH в образце.

#### *Определение глутатиона окисленного*

Анализ основан на конкурентном методе ИФА. Микропланшет в наборе сорбирован моноклональными антителами специфичными к овальбумину (OVA). Конкурентная реакция происходит в процессе инкубации в течение 30 мин при температуре 37° С между OVA, меченым биотином, немеченым OVA (содержащимся в образцах или контроле) и сорбированными антителами специфичными к OVA. После инкубации не связавшийся конъюгат удаляли отмывкой. Затем в микропланшет добавляли авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) и проводили инкубацию в течение 10 мин при температуре 37° С. Далее тщательно удаляли следы жидкости из планшета и отправляли его в микропланшетный ридер Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA), для проведения исследования при длине волны 450 нм. Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации OVA в образце.

#### *Определение глутатионпероксидазы*

Анализ проводили с использованием набора реагентов фирмы Cell Biolabs на микропланшетном ридере (Varioscan Thermo Fisher Scientific) при длине волны 340 нм. В качестве субстрата использовали гидропероксида кумола. GPX снижает

концентрацию гидропероксида кумола при окислении GSH до GSSG. Одна единица активности GPX была определена 1 мкмоль NADPH к NADP +.

#### *Определение глутатионредуктазы*

Для анализа в 96-луночный планшет добавили 25 мкл раствора 1X NADPH в каждую лунку, а затем по 100 мкл подготовленных стандартов глутатионредуктазы и исследуемых образцов. Затем в каждую лунку микропланшета внесли по 50 мкл 1X хромогена и перемешали. Завершающим этапом было внесение в каждую лунку планшета 25 мкл глутатиона дисульфида (GSSG). После перемешивания планшет немедленно отправляли в микропланшетный ридер Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA) и проводили измерение оптической плотности при длине волны 405 нм с интервалом в 1 минуту в течение 10 минут (кинетический анализ).

#### *Определение ROS*

Анализ проводили с использованием набора реагентов фирмы Cell Biolabs на микропланшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 480 нм. Концентрацию перекиси водорода в опытных пробах определяли по калибровочной кривой.

Статистический анализ. Полученные данные статистически обрабатывались с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 13.0» (Stat Soft, USA). Результаты исследования представлены как среднее значение со стандартной ошибкой ( $M \pm m$ ). Для определения статистически значимых различий между группами использовался t-критерий Стьюдента. Различия между группами считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В результате анализа полученных данных эксперимента было определено соотношение GSH/GSSG. Данные восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) показали значимые различия между контрольной группой и группами с субхронической интоксикацией ти-  
рамом (табл. 1).

Таблица 1

Влияние субхронической интоксикации тирамом и коррекции витамином А и расторопшей на соотношение GSH/GSSG

Table 1

Effect of subchronic intoxication with thiram and correction with vitamin A and milk thistle on the GSH / GSSG ratio

Показатель	Плазма крови			Ротовая жидкость		
	GSH, mkg/ml, (M ± m)	GSSG, mkg/ml, (M ± m)	GSH/GSSG	GSH, mkg/ml, (M ± m)	GSSG, mkg/ml, (M ± m)	GSH/GSS G
Группа 1. Контроль	148,43±14,16	0,69±0,06	215,11	256,98±25,89	1,50±0,15	171,32
Группа 2. Интоксикация 7-е сутки	90,15±9,38***	1,43±0,14***	63,04	160,31±16,63**	2,79±0,27***	57,45
Группа 3. Интоксикация 14-е сутки	81,52±8,44***	1,76±0,17***	46,31	148,03±14,90***	3,05±0,32***	48,53
Группа 4. Интоксикация 21-е сутки	60,94±6,21***	1,93±0,19***	31,57	128,42±13,13***	3,79±0,40***	33,88
Группа 5. Интоксикация 28-е сутки	56,33±6,90***	2,28±0,22***	24,71	112,94±11,53***	3,92±0,41***	28,81
Группа 6. Интоксикация+обычная еда	90,32±9,24*** <sup>xx</sup>	1,99±0,20***	45,38	127,93±12,98***	2,76±0,30*** <sup>x</sup>	46,35
Группа 7. Интоксикация+витамин А	153,07±15,10*** <sup>xxx</sup>	0,45±0,04*** <sup>xxx</sup>	340,15	264,30±27,53*** <sup>xxx</sup>	1,54±0,15*** <sup>xxx</sup>	171,62
Группа 8. Интоксикация+расторопша	136,82±13,51*** <sup>xxx</sup>	0,74±0,07*** <sup>xxx</sup>	184,89	233,88±25,59*** <sup>xxx</sup>	1,69±0,17*** <sup>xx x</sup>	138,39

Примечание: Данные представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка. \*\* – p<0,01 по сравнению с контрольной группой; \*\*\* – p<0,001 по сравнению с контрольной группой; <sup>x</sup> – p<0,05 по сравнению с группой «тирам 28 сут.»; <sup>xx</sup> – p<0,01 по сравнению с группой «тирам 28 сут.», <sup>xxx</sup> – p<0,001 по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Note: Data represent mean ± standard error. \*\* – p <0.01 compared with the control group; \*\*\* – p <0.001 compared with the control group; <sup>x</sup> – p <0.05 compared with the group "Thir. 28 days"; <sup>xx</sup> – p <0.01 compared with the group "Thir. 28 days", <sup>xxx</sup> – p <0.001 compared with the group "Thir. 28 days".

Применение тирама привело к значительному снижению показателей GSH и повышению значений GSSG, как в плазме крови, так и в ротовой жидкости. Максимальные изменения были достигнуты в группе 5. На 28 день интоксикации в плазме крови значение восстановленного глутатиона снизилось в 2,63 раза, в ротовой жидкости – в 2,27 раза. Окисленный глутатион в группе 5 увеличился в плазме в 3,3 раза, в ротовой жидкости – в 2,61 раза. Возврат к стандартному рациону после проведения субхронической интоксикации тирамом привел к незначительному восстановлению исследуемых показателей. В плазме крови GSH изменился в 1,6 раза по отношению к группе 5 и в 1,64 раза по отношению к контрольным значениям, в ротовой жидкости: в 1,13 раза и в 2,01 раза, соответственно. GSSG в плазме крови был восстановлен в 1,14 раза по отношению к значениям полученным в группе 5 и в 2,88 раза по отношению к значениям в группе 1. При исследовании окисленного глутатиона наблюдалась аналогичная тенденция: в плазме крови значения изменились в 1,42 раза и в 1,84 раза, соответственно. Применение витамина А позволило полностью восстановить показатели GSH и GSSG до контрольных значений в плазме крови. Однако при исследовании ротовой жидкости до контрольных цифр был восстановлен только GSH. В группе 8 контрольные значения не были достигнуты ни в одном из образцов.

Соотношение восстановленного и окисленного глутатиона снижалось на протяжении всего периода моделирования субхронической интоксикации тирамом в плазме крови и ротовой жидкости. Максимальные изменения были отмечены в группе 5: в плазме крови соотношение GSH/GSSG снизилось в 8,71 раза, а в ротовой жидкости – в 5,95 раза, по отношению к контрольным значениям. Незначительное восстановление исследуемого соотношения отмечалось при переходе к стандартному рациону после проведения интоксикации на протяжении 28 дней. В плазме значение изменилось в 1,84 раза по отношению к

группе 5 и в 4,74 раза по отношению к контрольному показателю. В сравнении с группой 5 в ротовой жидкости соотношение GSH/GSSG восстановилось в 1,61 раза, а по отношению к группе 1 – в 3,69 раза. При проведении антиоксидантной терапии наибольший восстановительный эффект был отмечен в группе 7, где произошло полное восстановление баланса между восстановленным и окисленным глутатионом, по отношению к контрольной группе, как в плазме крови так и в ротовой жидкости. Экстракт расторопши также обладает выраженным антиоксидантным действием, но значения контрольной группы достигнуты не были.

В таблице 2 указаны изменения GPX и GSR.

При исследовании активности антиоксидантных ферментов показано, что каталитическая активность глутатионредуктазы на протяжении всего периода хронической интоксикации ТМДТ увеличивалась и на 28 сутки достигла максимальных значений (в плазме крови увеличение произошло в 2,66 раза, в ротовой жидкости – в 2,25 раза, в сравнении с группой контроля). При переходе на стандартный рацион значения GSR незначительно изменились и в плазме крови и в ротовой жидкости. После проведения антиоксидантной терапии витамином А активность глутатионпероксидазы значительно была восстановлена в ротовой жидкости и достигла контрольных значений в плазме крови. При применении экстракта расторопши восстановление до контрольных значений GSR отмечено не было.

Максимальные значения GPX были достигнуты на 28 сутки субхронической интоксикации (в плазме крови в 1,42 раза, в ротовой жидкости в 2,09 раза выше в сравнении с группой 1). Перевод животных на обычное питание незначительно снизило показатель GPX. В плазме крови GPX изменился в 1,12 раза по отношению к группе 5 и в 1,25 раза по отношению к группе 1; в ротовой жидкости: в 1,32 раза и в 1,58 раза, соответственно.

Таблица 2

Влияние субхронической интоксикации тирамом и коррекции витамином А и расторопшей на показатели GPX и GSR

Table 2

Effect of subchronic intoxication with thiram and correction with vitamin A and milk thistle on GPX and GSR

Показатель	Плазма крови		Ротовая жидкость	
	GPX, mU/mL, (M ± m)	GSR, mU/ml, (M ± m)	GPX, mU/mL, (M ± m)	GSR, mU/ml, (M ± m)
Группа 1. Контроль	40,12±4,75	4,75±0,53	23,94±2,43	3,11±0,33
Группа 2. Интоксикация 7-е сутки	59,65±5,95*	7,23±0,73**	40,13±4,07***	5,37±0,59***
Группа 3. Интоксикация 14-е сутки	61,73±6,56*	9,39±0,93***	45,77±4,96***	5,98±0,62***
Группа 4. Интоксикация 21-е сутки	58,42±6,77*	11,44±1,21***	47,44±4,82***	6,31±0,63***
Группа 5. Интоксикация 28-е сутки	56,98±5,44*	12,64±1,24***	50,21±5,41***	7,02±0,72***
Группа 6. Интоксикация+обычная еда	50,54±5,46	12,46±1,26***	37,92±3,91**	6,92±0,72***
Группа 7. Интоксикация+витамин А	30,31±3,46** <sup>XXX</sup>	3,80±0,37*** <sup>XXX</sup>	19,03±1,99*** <sup>XXX</sup>	3,36±0,49 <sup>XX</sup>
Группа 8. Интоксикация+расторопша	45,29±4,92	5,81±0,60*** <sup>XXX</sup>	26,62±2,93 <sup>XX</sup>	4,65±0,34*** <sup>XXX</sup>

Примечание: Данные представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка. \* - p<0,05 по сравнению с контрольной группой, \*\* - p<0,01 по сравнению с контрольной группой, \*\*\* - p<0,001 по сравнению с контрольной группой; <sup>XX</sup> - p<0,01 по сравнению с группой «тирам 28 сут.», <sup>XXX</sup> - p<0,001 по сравнению с группой «тирам 28 сут.». Note: Data represent mean ± standard error. \* - p <0.05 compared with the control group; \*\* - p <0.01 compared with the control group; \*\*\* - p <0.001 compared with the control group; <sup>XX</sup> - p <0.01 compared with the group "Thir. 28 days"; <sup>XXX</sup> - p <0.001 compared with the group "Thir. 28 days".



После интоксикации проведение антиоксидантной терапии витамином А и экстрактом расторопши дали положительный результат по снижению активности глутатионпероксидазы, но применение ретинола

ацетата показало большую эффективность и привело к ее полному восстановлению до контрольных значений в плазме крови и ротовой жидкости.

В таблице 3 указаны изменения ROS.

Таблица 3

**Влияние субхронической интоксикации тирамом и коррекции витамином А и расторопшей на показатель ROS**

Table 3

**Influence of subchronic intoxication with thiram and correction with vitamin A and milk thistle on ROS**

Показатель	Плазма крови	Ротовая жидкость
	ROS, mkmol/L, (M ± m)	ROS, mkmol/L, (M ± m)
Группа 1. Контроль	0,26±0,02	26,98±0,47
Группа 2. Интоксикация 7-е сутки	0,50±0,05***	45,81±4,73***
Группа 3. Интоксикация 14-е сутки	0,61±0,06***	49,69±4,99***
Группа 4. Интоксикация 21-е сутки	0,72±0,07***	53,71±5,67***
Группа 5. Интоксикация 28-е сутки	0,85±0,08***	55,06±5,68***
Группа 6. Интоксикация+обычная еда	0,64±0,06*** <sup>X</sup>	51,88±5,40***
Группа 7. Интоксикация+витамин А	0,28±0,02*** <sup>XXX</sup>	25,22±2,85*** <sup>XXX</sup>
Группа 8. Интоксикация+расторопша	0,30±0,03*** <sup>XXX</sup>	33,24±3,67*** <sup>XXX</sup>

Примечание: Данные представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка. \*\*\* -  $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой; <sup>X</sup> -  $p < 0,05$  по сравнению с группой «тирам 28 сут.»; <sup>XXX</sup> -  $p < 0,001$  по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Note: Data represent mean ± standard error. \*\*\* -  $p < 0.001$  compared with the control group; <sup>XX</sup> -  $p < 0.01$  compared with the group "Thir. 28 days"; <sup>X</sup> -  $p < 0.05$  compared with the group "Thir. 28 days"; <sup>XXX</sup> -  $p < 0.001$  compared with the group "Thir. 28 days".

В результате субхронической интоксикации ТМДТ в плазме крови и ротовой жидкости наблюдалось увеличение ROS. Максимальных значений этот показатель достиг на 28 сутки. В 6 группе активность свободных радикалов снизилась незначительно по отношению к группе 1 (в плазме крови – в 2,46 раза; в ротовой жидкости – в 1,92 раза) и по отношению к группе 5 (в плазме крови – в 1,32 раза; в ротовой жидкости – в 1,06 раза). В 7 группе при применении после интоксикации витамина А в качестве антиоксиданта показатель свободных радикалов снизился до контрольных значений только в ротовой жидкости. После применения экстракта расторопши в качестве антиоксиданта показатель снижался, но контрольных значений не достиг ни в одном из образцов.

**Обсуждение.** Поступление в организм пестицидных препаратов оказывает

токсическое воздействие посредством образования активных форм кислорода. Подавление образования свободных радикалов происходит за счет выработки антиоксидантных ферментов, одним из которых является глутатионпероксидаза. Нами показано, что введение фунгицидного препарата тирам на протяжении 28-и суток приводит к значительному увеличению содержания ROS, повышению активности GPX, GSR ( $p < 0,05$ ).

В плазме крови и ротовой жидкости животных во время моделирования субхронической интоксикации ТМДТ отмечалось снижение соотношения GSH/GSSG. Использование витамина А и экстракта расторопши в течение 28 суток после проведения экспериментальной субхронической интоксикации, привело к восстановлению показателей активности исследуемых ферментов. При коррекции витамином А значения

GSH, GSSG и соотношение GSH/ GSSG было полностью восстановлено до контрольных значений, а использование экстракта расторопши привело показатели к значениям максимально приближенным к контрольным.

Рядом исследователей показано, что снижение количества GSH в клетках являлось результатом действия тирама. Однако до конца не было изучено влияние тирама на ферментативное звено антиоксидантной системы и не показано, как изменяется соотношение восстановленного глутатиона к окисленному после проведения интоксикации тирамом, а также после применения антиоксидантной терапии.

Детоксикация АФК происходит с помощью ферментативной системы (через глутатионпероксидазу). Чрезмерное образование GSSG опасно для клеток организма, так как избыток окисленного глутатиона приводит к истощению общего GSH, что мы наблюдали на 28 сутки интоксикации тирама. Удаление GSSG связано с увеличением активности глутатионредуктазы (GSR), которая превращает GSH из GSSG в НАДФН зависимой реакции [12]. В нашей работе отмечено, что уровень GSSG и активность GSR одновременно увеличиваются после применения тирама по сравнению с контрольными значениями. Похожие результаты были получены и при применении тирама в дозе 150 мкг [9]. Несмотря на повышенные уровни GSSG, а также активность GSR, соотношение GSH/GSSG при интоксикации было значительно ниже, чем в контрольной группе, что говорит о истощении активности антиоксидантного барьера.

Во время проведения интоксикации в плазме крови отмечается постепенное снижение активность GPX, что вероятно нарушает процесс перехода  $H_2O_2$  в  $H_2O$ . Накопление  $H_2O_2$ , влечет за собой высокое производство ОН радикалов, что в свою очередь подтверждается увеличением значения ROS в течение всего периода интоксикации. Блюм и Фридович (1985) обнаружили, что активность GPX может быть инактивирована в условиях окислительного стресса

супероксид-анионом и токсичными лигандами, такими как малоновый диальдегид, которые могут частично подавляют активность глутатионпероксидазы [11].

Ротовая полость является первой линией защиты от действия ксенобиотиков при их поступлении в организм [19]. При увеличении производства активных форм кислорода (АФК) и снижении каталитической активности антиоксидантных ферментов может происходить окислительное повреждение клеточных компонентов, как в слюнных железах, так и в пародонте [20, 21]. Окислительный стресс играет основную роль в патогенезе дисфункции слюнных желез, ксеростомии, пародонтита, предраковых состояний и рака полости рта [22, 23]. Поэтому ротовая жидкость может рассматриваться как своеобразный индикатор прооксидантно-антиоксидантного баланса как в ротовой полости, так и в организме в целом. В нашем исследовании показано, что окислительный стресс в ротовой полости вызывает более значимые изменения в системе антиоксидантной защиты, чем в плазме крови: отмечается более высокая концентрация GSH, GSSG и ROS, а при проведении фармакологической коррекции растительные антиоксиданты в ротовой жидкости в большей степени проявляют антиокислительные свойства.

**Выводы.** В настоящем исследовании, нами установлено, что переход к стандартному рациону после субхронической интоксикации позволяет незначительно восстановить контрольные значения всех исследуемых показателей. Это является следствием включения компенсаторных механизмов организма, направленных на борьбу с негативными последствиями окислительного стресса. Использование витамина А, а также экстракта расторопши привело к значительному восстановлению системы АОЗ до уровня контрольных значений. Значительные изменения в нашем исследовании были отмечены при применении витамина А, что подтверждает его высокие антиоксидантные свойства. Полученные результаты могут быть использованы при проведении антиоксидантной терапии

для купирования процессов окислительного стресса.

### Информация о финансировании

*Работа выполнена за счет средств Курского государственного медицинского университета.*

### Financial support

*The study was carried out at the expenses of Kursk State Medical University.*

### Конфликт интересов

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

### Conflict of interests

*The authors have no conflict of interest to declare.*

### Список литературы

1. International Agency for Research on Cancer, 1991. IARC working group, Thiram. In: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 53. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1991:403-422.
2. Cereser C, Boget S, Parvaz P, et al. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. Toxicology Reports. 2001;163(2-3):153-162. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00401-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00401-2)
3. Королев ВА, Королев ИВ, Харланов НА, и др. Изменение показателей липидного состава клеточных мембран в условиях пестицидной интоксикации и способы их профилактики. Научный результат. Медицина и фармация. 2017;3(4):11-16. DOI: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2017-3-4-11-16>
4. Терехина НА, Петрович ЮА. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная система. Пермь: ГОУ ВПО «ПГМА МЗ»; 2005.
5. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertility and Sterility. 2003;79(4):829-843. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
6. Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. Reviews on Environmental Health. 2001;16(1):1-40. DOI: <https://doi.org/10.1515/reveh.2001.16.1.1>
7. Elskens MT, Penninckx MJ. Thiram and dimethyldithiocarbamic acid interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*: a possible metabolic pathway under the control of the glutathione redox cycle. Applied and Environmental Microbiology. 1997;63(7):2857-2862. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2857-2862.1997>
8. Калинина ЕВ, Чернов НН, Новичкова МД. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. Успехи биологической химии. 2014;54:299-348.
9. Grosicka E, Sadurska B, Szumilo M, et al. Effect of glutathione depletion on apoptosis induced by thiram in chinese hamster fibroblasts. International Immunopharmacology. 2005;5(13-14):1945-1956. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.06.017>
10. Arthur JR. The glutathione peroxidases. Cellular and Molecular Life Sciences. 2000;57:1825-1835. DOI: <https://doi.org/10.1007/PL00000664>
11. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1985;240(2):500-508. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90056-6)
12. Yang MS, Chan HW, Yu LC. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. Toxicology Reports. 2006;226(2-3):126-130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.008>
13. Королев ВА, Ляшев ЮД, Грибач ИВ, и др. Изменение прооксидантно-антиоксидантного баланса при хронической интоксикации бензолом и эффективность профилактических мероприятий с применением мексидола. Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". 2014;2:19-22.
14. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions. 2006;160(1):1-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
15. Питкевич ЭС, Лызилов АН, Цаприлова СВ. Расторопша пятнистая – *Silybum marianum* (L.). Проблемы здоровья и экологии. 2008;4:119-126.
16. Goodman DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. New England Journal of Medicine. 1984;310(16):1023-31. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM198404193101605>

17. Белов ДА. Химические методы и средства защиты растений в лесном хозяйстве и озеленении: Учебное пособие для студентов. М.: МГУЛ. 2003;128.

18. Хабриев РУ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина. 2005;832.

19. Zalewska A, Knaś M, Kuźmiuk A, et al. Salivary innate defense system in type 1 diabetes mellitus in children with mixed and permanent dentition. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2013;71(6):1493-1500. DOI: <https://doi.org/10.3109/00016357.2013.773071>

20. Zalewska A, Knaś M, Maciejczyk M, et al. Antioxidant profile, carbonyl and lipid oxidation marker in the parotid and submandibular glands of rats in different periods of streptozotocin induced diabetes. *Archives of Oral Biology*. 2015;60(9):1375-1386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.06.012>

21. Żukowski P, Maciejczyk M, Danuta W. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*. 2018;92:8-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.04.018>

22. Jankowska AK, Waszkiel D, Kobus A, et al. Saliva as a main component of oral cavity ecosystem. *Wiadomości Lekarskie*. 2007;60(5-6):253-257.

23. Reznick AZ, Klein I, Eiserich JP, et al. Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: in vivo and in vitro studies. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003;34(3):377-384. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01297-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01297-2)

## References

1. International Agency for Research on Cancer, 1991. IARC working group, Thiram. In: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 53. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1991:403-422.

2. Cereser C, Boget S, Parvaz P, et al. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology Reports*. 2001;163(2-3):153-162. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00401-2](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00401-2)

3. Korolev VA, Korolev IV, Kharlanov NA, et al. Change of indicators of lipid composition of cell membranes in the conditions of pesticidal intoxication and methods of their prevention. *Research Result. Medicine and Pharmacy*.

2017;3(4):11-16. Russian. DOI: <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2017-3-4-11-16>

4. Terekhina NA, Petrovich YuA. Free radical oxidation and antioxidant system. Perm: GOU VPO «PGMA MZ»; 2005. Russian.

5. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. 2003;79(4):829-843. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)

6. Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Reviews on Environmental Health*. 2001;16(1):1-40. DOI: <https://doi.org/10.1515/reveh.2001.16.1.1>

7. Elskens MT, Penninckx MJ. Thiram and dimethyldithiocarbamic acid interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*: a possible metabolic pathway under the control of the glutathione redox cycle. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63(7):2857-2862. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2857-2862.1997>

8. Kalinina. EV, Chernov NN, Novichkova MD. The role of glutathione, glutathione transferase and glutaredoxin in the regulation of redox-dependent processes. *Advances in biological chemistry. Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2014;54:299-348. Russian.

9. Grosicka E, Sadurska B, Szumilo M, et al. Effect of glutathione depletion on apoptosis induced by thiram in chinese hamster fibroblasts. *International Immunopharmacology*. 2005;5(13-14):1945-1956. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.06.017>

10. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000;57:1825-1835. DOI: <https://doi.org/10.1007/PL00000664>

11. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1985;240(2):500-508. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90056-6)

12. Yang MS, Chan HW, Yu LC. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology Reports*. 2006;226(2-3):126-130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.008>

13. Korolev VA, Lyashev YuD, Gribach IV, et al. Changes in the prooxidant-antioxidant balance in chronic intoxication with bankol and the effectiveness of preventive measures with the use



of Mexidol. Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorovye". 2014;2:19-22. Russian.

14. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;160(1):1-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>

15. Pitkevich ES, Lyzikov AN, Tsaprilova SV. Milk thistle - *Silybum marianum* (L.). *Health and Ecology Issues*. 2008;4:119-126. Russian.

16. Goodman DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. *New England Journal of Medicine*. 1984;310(16):1023-31. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM198404193101605>

17. Belov DA. Chemical methods and means of plant protection in forestry and landscaping: A textbook for students. M.: MGUL. 2003;128. Russian.

18. Habriev RU. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological agents. M.: Medicina. 2005;832. Russian.

19. Zalewska A, Knaś M, Kuźmiuk A, et al. Salivary innate defense system in type 1 diabetes mellitus in children with mixed and permanent dentition. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2013;71(6):1493-1500. DOI: <https://doi.org/10.3109/00016357.2013.773071>

20. Zalewska A, Knaś M, Maciejczyk M, et al. Antioxidant profile, carbonyl and lipid oxidation marker in the parotid and submandibular glands of rats in different periods of streptozotocin induced diabetes. *Archives of Oral Biology*. 2015;60(9):1375-1386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.06.012>

21. Żukowski P, Maciejczyk M, Danuta W. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*. 2018;92:8-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.04.018>

22. Jankowska AK, Waszkiel D, Kobus A, et al. Saliva as a main component of oral cavity ecosystem. *Wiadomości Lekarskie*. 2007;60(5-6):253-257.

23. Reznick AZ, Klein I, Eiserich JP, et al. Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: in vivo and in vitro studies. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003;34(3):377-384. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01297-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01297-2)

Статья поступила в редакцию 13 октября 2021 г.

Поступила после доработки 10 февраля 2022 г.

Принята к печати 28 февраля 2022 г.

Received 13 October 2021

Revised 10 February 2022

Accepted 28 February 2022

### Информация об авторах

**Владимир Анатольевич Королев**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биологии, медицинской генетики и экологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: [medecol1@yandex.ru](mailto:medecol1@yandex.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4376-4284>.

**Анастасия Валерьевна Седых**, ассистент кафедры биологии, медицинской генетики и экологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: [turquoise95@mail.ru](mailto:turquoise95@mail.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6117-0666>.

**Юлия Эдуардовна Азарова**, кандидат медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: [azarovaje@kursksmu.net](mailto:azarovaje@kursksmu.net), ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8098-8052>.

**Елена Викторовна Фелькер**, кандидат медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: [felkerv@kursksmu.net](mailto:felkerv@kursksmu.net), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7948-7290>.

**Лилия Александровна Ячmeneва**, ассистент кафедры ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: [baggyrita@gmail.com](mailto:baggyrita@gmail.com), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2642-6512>.

**Иван Владимирович Королев**, студент ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: [korolevva@kursksmu.net](mailto:korolevva@kursksmu.net), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6335-4311>.

**Егор Владимирович Королев**, студент ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Российская Федерация, E-mail: [korolevva@kursksmu.net](mailto:korolevva@kursksmu.net), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3324-8689>.

### Information about the authors

**Vladimir A. Korolev**, Doct. Sci. (Biology), Professor, Head of the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Kursk State Medical



University, Kursk, Russia, E-mail: medecoll@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4376-4284>.

**Anastasia V. Sedykh**, Assistant Lecturer at the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: turquoise95@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6117-0666>.

**Yulia E. Azarova**, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of Laboratory, Research Institute of Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: azarovaje@kursksmu.net, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8098-8052>.

**Elena V. Felker**, Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Prosthetic

Dentistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: felkerev@kursksmu.net, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7948-7290>.

**Lilia A. Yachmeneva**, Assistant Lecturer at the Department of Prosthetic Dentistry, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: baggyrita@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2642-6512>.

**Ivan V. Korolev**, Student, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: korolevva@kursksmu.net, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6335-4311>.

**Egor V. Korolev**, Student, Kursk State Medical University, Kursk, Russia, E-mail: korolevva@kursksmu.net, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3324-8689>.