

DOI: 10.28996/2618-9801-2021-2-219-224

Изучение цитотоксического действия уремического токсина индоксилсульфата на миобласты *in vitro*, экспрессию мРНК миостатина в культуре клеток миобластов и возможности экзогенной регуляции

В.А. Фуралев^{*1}, В.Г. Кукес^{**2}, А.А. Газданова^{***2}

¹ Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, 119048, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Российская Федерация

A study of cytotoxic effect of the uremic toxin indoxyl sulfate on myoblasts *in vitro*, the expression of myostatin mRNA in myoblast cell culture, and the possibility of exogenous regulation

V.A. Furalyov^{*1}, V.G. Kukes^{**2}, A.A. Gazdanova^{***2}

¹ Federal research center "Fundamentals of biotechnology" of the Russian Academy of sciences., 33/2 Leninsky av., Moscow, 119071, Russian Federation

² Department of Clinical Pharmacology and Propedeutics of Internal Diseases, Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2 Trubetskaya street, Moscow, 119048, Russian Federation

Ключевые слова: индоксилсульфат, хроническая почечная недостаточность, миостатин, этилметилгидроксифидина малат (этоксидол)

Резюме

Обоснование: индоксилсульфат – уремический токсин, рассматриваемый как один из источников развития мышечной слабости (кахексии) у пациентов с почечной недостаточностью, ухудшающей прогноз жизни данной категории пациентов.

Цель исследования: изучение возможности экзогенной регуляции токсического влияния индоксилсульфата на миобласты *in vitro*.

Материал и методы: культуру первичных миобластов мыши получали по стандартной методике. Клетки культивировали в среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FST) (Gibco) при 37 °С и 6% CO₂. Изучение влияния индоксилсульфата на скорость пролиферации миобластов проводили путём измерения скорости восстановления бромиды 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ, Sigma). Для измерения экспрессии миостатина РНК из миобластов мыши выделялась с помощью реагента Trizol («Thermo Fisher Scientific»). Обратная транскрипция

Адрес для переписки: Альбина Амырхановна Газданова
e-mail: al.gazdanova@gmail.com

Corresponding author: Dr. Albina A. Gazdanova
e-mail: al.gazdanova@gmail.com

* <http://orcid.org/0000-0001-5039-0500>

** <https://orcid.org/0000-0002-5112-6928>

*** <https://orcid.org/0000-0001-7099-4547>

проводилась с помощью набора реагентов фирмы «Силекс». Для сравнения экспрессии миоастатиновой мРНК в миоблестах применялся метод полимеразной цепной реакции в реальном времени. Амплификация проводилась в следующем режиме: активация HotTaq-полимеразы – 95 °С, 5 мин; денатурация – 95 °С, 15 с; отжиг и элонгация – 60 °С, 1 мин; 40 циклов. Использовались следующие праймеры: миоастатин прямой 5'-CAGCCTGAATCCAACTTAGG-3', миоастатин обратный 5'-TCGCAGTCAAGCCCAAAGTC-3', ГАФД прямой 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGACT-3', ГАФД обратный 5'-CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT-3'. Этилметилгидроксипиридина малат был использован в физиологической концентрации равной 70 мкг/мл.

Результаты: нами показано, что индоксилсульфат оказывает значительное цитостатическое действие на миоблесты *in vitro*, подавляя их пролиферацию. Этилметилгидроксипиридина малат показал статистически достоверный протективный эффект в отношении миобластов, обработанных указанным токсикантом. В экспериментах по исследованию экспрессии миоастатиновой мРНК индоксилсульфат не активировал эту экспрессию, как во временном интервале 48 часов, так и во временном интервале 72 часа. Экспрессия мРНК миоастатина, возросла при совместном использовании индоксилсульфата и этилметилгидроксипиридина малата через 48 часов и сохранялась через 72 часа.

Выводы: этилметилгидроксипиридина малат, нивелируя токсическое действие индоксилсульфата, оказывает протективное влияние на миоблесты *in vitro*. Механизм совместной активации экспрессии мРНК миоастатина индоксилсульфата и этилметилгидроксипиридина малата остается не совсем ясным и требует дальнейшего изучения.

Abstract

Introduction: indoxyl sulfate is a uremic toxin considered as one of the sources of muscle failure (cachexia) in patients with renal failure; this category of patients has a poor prognosis.

Objective: an examination of the possibilities of exogenous regulation of the influence of indoxyl sulfate on myoblasts *in vitro*.

Material and methods: the culture of primary mouse myoblasts was obtained according to the standard method. The cells were cultured in DMEM medium with 10% fetal calf serum (FST) (Gibco) at 37 °C and 6% CO₂. The study of the effect of indoxyl sulfate on the proliferation rate of myoblasts was carried out by measuring the rate of reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma). To measure the expression of myostatin, RNA was isolated from mouse myoblasts using the Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific). Reverse transcription was performed using a set of reagents from Silex. To compare the expression of myostatin mRNA in myoblasts, a real-time polymerase chain reaction was used. Ethylmethylhydroxypyridine malate was used at a physiological concentration of 70 µg/ml.

Results: we have shown that indoxyl sulfate has a significant cytostatic effect on myoblasts *in vitro*, suppressing their proliferation. Ethyl methyl hydroxypyridine malate showed a statistically significant protective effect for myoblasts treated with the toxicant. In experiments where the expression of myostatin mRNA was studied, indoxyl sulfate did activate the expression for either 48 hours or 72 hours. However, the expression of myostatin mRNA increased with the combined use of indoxyl sulfate and ethylmethylhydroxypyridine malate for 48 hours and persisted after 72 hours.

Conclusion: ethylmethylhydroxypyridine malate, leveling the toxic effect of indoxyl sulfate, has a protective effect on myoblasts *in vitro*. The mechanism of joint activation of mRNA expression of myostatin indoxyl sulfate and ethylmethylhydroxypyridine malate remains unclear and requires further study.

Key words: indoxyl sulfate, chronic renal failure, myostatin, ethylmethylhydroxypyridine malate (ethoxpydol)

Индоксилсульфат – уремический токсин, образующийся в результате расщепления аминокислоты триптофана бактериями толстой кишки. Из организма выводится в большей степени путем канальцевой секреции. Это небольшая молекула, которая более чем на 90% связана с белками плазмы. Индоксилсульфат накапливается в высоких концентрациях в плазме крови у пациентов, находящихся на гемодиализе, поскольку только свободный, несвязанный материал может диффундировать через диализную мембрану. Обсуждается роль индоксилсульфата в развитии саркопении и кахексии у пациентов с почечной недостаточностью [1]. Кахексия при

почечной недостаточности значительно ухудшает качество и прогноз жизни данной категории больных. Механизм действия индоксилсульфата малоизучен, некоторые исследователи предполагают, что он стимулирует образование свободных радикалов и индуцирует экспрессию миоастатина, а также нарушает функцию митохондрий [2, 3]. Как показано в ряде исследований, индоксилсульфат может участвовать в механизмах прогрессирования как почечной недостаточности [4], сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6], минерально-костных нарушений [7], оказывать неблагоприятное влияние на центральную нервную систему [8]. Понимание конкретных

механизмов реализации патогенного действия индоксилсульфата может стать основой для разработки новых и использования имеющихся лекарственных препаратов.

Цель исследования: изучение возможности экзогенной регуляции токсического влияния индоксилсульфата на миобласты *in vitro*.

Материал и методы: культуры первичных миобластов мыши получали по стандартной методике [9]. Клетки культивировали в среде DMEM с 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (Gibco) при 37 °С и 6% CO₂.

Индоксилсульфат использовался в концентрации 1 мМ, поскольку в данной концентрации токсикант не вызывает существенной гибели мышечных клеток (что подтверждает окраска трипановым синим). Изучение влияния индоксилсульфата на скорость пролиферации миобластов проводили путём измерения скорости восстановления бромидо 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (MTT, Sigma) [10]. Для измерения скорости восстановления MTT клетки рассеивали в среде DMEM с 10%-й ЭТС в количестве 2×10³ на лунку 96-луночного планшета (Corning-Costar). На следующий день культуральную среду в лунках заменяли на свежие аликвоты по 150 мкл той же среды и спустя 10 часов добавляли исследуемый реагент в 50 мкл той же среды, в качестве контроля использовали DMEM с 10%-й ЭТС. Спустя 24 часа среду в лунках заменяли на 0,2 мл свежей среды с 0,5 мг/мл MTT и оставляли на 4 часа. Затем клетки лизировали в 0,15 мл диметилсульфоксида и измеряли оптическую плотность при 595 нм с помощью планшетного фотометра Thermo Labsystems. Каждая экспериментальная точка представляет собой средний результат 16 лунок планшета.

Для измерения экспрессии миостатина РНК из миобластов мыши выделялась с помощью реагента Trizol («Thermo Fisher Scientific»). Обратная транскрипция проводилась с помощью набора реагентов фирмы «Силекс». Для сравнения экспрессии миостатиновой мРНК в миобластах, обработанных различными реагентами, применялся метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Для проведения ПЦР-РВ использовался набор реагентов фирмы «Синтол» с красителем SYBR Green. Амплификация проводилась в следующем режиме: активация HotTaq-полимеразы – 95 °С, 5 мин; денатурация – 95 °С, 15 с; отжиг и элонгация – 60 °С, 1 мин; 40 циклов. Использовались следующие праймеры [11]: миостатин прямой 5'-CAGCCTGAATCCAACCTAGG-3', миостатин обратный 5'-TCGCAGTCAAGCCCAAGTC-3', ГАФД прямой 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGACT-3', ГАФД обратный 5'-CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT-3'. Амплификация и детекция продуктов проводилась на приборе CFX96 фирмы «Bio-Rad». Для расчетов экспрессии миостатиновой мРНК использовался

метод разности пороговых циклов. Для каждой пробы определялась разность порогового цикла амплификации (C_T) миостатина и ГАФД (DC_T = C_T миостатина – C_T ГАФД). Затем подсчитывалась разность между DC_T различных проб (DDC_T = DC_T пробы 1 – DC_T пробы 2). Сравнительный уровень экспрессии миостатина подсчитывали по формуле 2^{-DDC_T}. Каждая экспериментальная точка представляет собой средний результат 4 независимых измерений.

Этилметилгидроксипиридина малат был использован в физиологической концентрации равной 70 мкг/мл.

Анализ результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica. Достоверность различий оценивалась с помощью *t*-критерия Стьюдента. Статистически достоверными считали значения *p*<0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты эксперимента по исследованию цитостатического действия индоксилсульфата на миобласты представлены на рисунке 1. Индоксилсульфат обладал значительным цитостатическим действием на культуры миобластов: скорость восстановления MTT у миобластов, обработанных индоксилсульфатом, составляла лишь 57% от таковой скорости у контрольных миобластов.

Этилметилгидроксипиридина малат сам не оказывал влияния на скорость пролиферации миобластов, но продемонстрировал статистически достоверный протективный эффект на культурах миобластов, обработанных индоксилсульфатом: при совместной обработке этоксиолом и индоксилсульфатом скорость восстановления MTT снижалась только до 66% от контрольных культур, выращиваемых без всяких обработок. Различие величины скорости восстановления MTT в культурах миобластов, обработанных одним индоксилсульфатом, и в культурах, обработанных индоксилсульфатом с этилметилгидроксипиридина малатом, было статистически достоверно с *p*<0,05 по критерию Стьюдента.

Результаты эксперимента по изучению влияния индоксилсульфата на уровень мРНК миостатина, представлены на рисунке 2. Миостатин – миокин, фактор роста и дифференцировки 8, (Growth and Differentiation factor-8, GDF-8) относится к семейству ростовых факторов – transforming growth factor β-family (TGF-β), ген которого был идентифицирован А. McPherron с соавт. из Университета Джона Гопкинса (США) в 1997 году [12]. Данные ряда исследований свидетельствуют о значимой роли миостатина, белка, секретируемого миоцитами, в патогенезе многих заболеваний, сопровождающихся нарушением функции мышц: наследственных миодистрофий, старческой саркопении, раковой кахексии, кахексии при сердечной

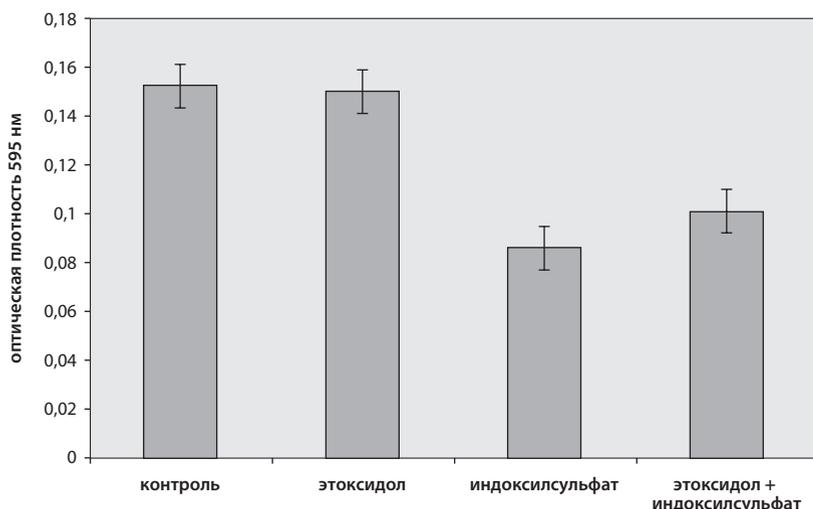


Рис. 1. Протективное влияние этилметилгидроксипиридина малата на вызванное индоксилсульфатом снижение скорости восстановления МТТ культурами миобластов. Показаны значения оптической плотности при 595 нм \pm выборочное стандартное отклонение (σ_{n-1}).

Fig. 1. The protective effect of ethylmethylhydroxypyridine malate on indoxyl sulfate-induced decrease in MTT recovery rate by myoblast cultures. Optical density values at 595 nm \pm sample standard deviation (σ_{n-1}).

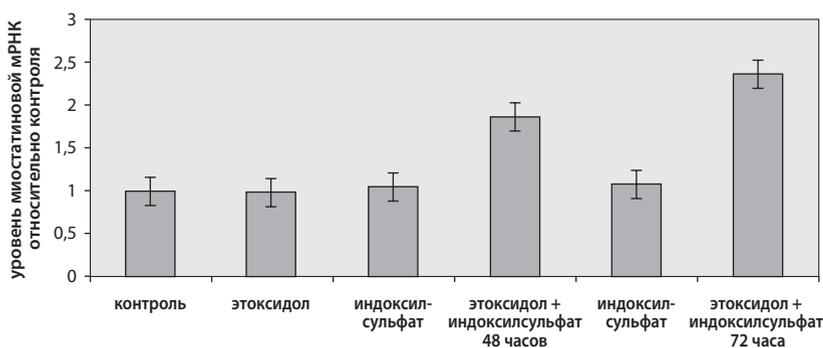


Рис. 2. Влияние этилметилгидроксипиридина малата в присутствии индоксилсульфата на уровень мРНК миоастатина. Показаны уровни мРНК миоастатина относительно контроля \pm выборочное стандартное отклонение (σ_{n-1}).

Fig. 2. The effect of ethylmethylhydroxypyridine malate in the presence of indoxyl sulfate on the level of myostatin mRNA.

Myostatin mRNA levels are shown relative to the control \pm selective standard deviation (σ_{n-1}).

и почечной недостаточности, циррозе печени [13]. В экспериментальных работах показано, что индоксил-сульфат накапливался в скелетной мышце и индуцировал синтез супероксид-иона у нефрэктомированных мышей. Хроническое введение индоксил-сульфата значительно уменьшало вес тела, что сопровождалось потерей мышечной массы. Инактивация Smad3 в культивируемых фибро-адипогенных клетках-предшественниках прерывало их превращение в фиброциты, указывая на ключевую роль миоастатина в этом процессе, то есть, в развитии фиброза [14]. Исследование концентрации миоастатина у больных с хронической почечной не-

достаточностью позволило другой группе авторов предположить, что активация экспрессии миоастатина уремическими токсинами является важной причиной развития белково-энергетической недостаточности, приводящей к саркопении и кахексии у данных больных и являющейся самостоятельным предиктором смертности [15, 16].

В отличие от изложенных в статье [17] наблюдений, в нашем исследовании индоксилсульфат не стимулировал экспрессию миоастатина. Было исследовано влияние данного токсиканта на протяжении двух временных интервалов – 48 часов и 72 часа. В обоих случаях не было обнаружено никакого влияния индоксилсульфата на экспрессию миоастатина. Механизм действия индоксилсульфата на клетки малоизучен, и можно предположить, что он активизирует образование высокоактивных форм кислорода лишь в небольшой степени. Ещё одной возможной причиной расхождения наших результатов может быть различие в объекте исследования. Авторы вышеупомянутой работы использовали в качестве модели бессмертную линию миобластов C2C12. Известно, что бессмертные стабилизированные клеточные линии отличаются от клеток организма по целому ряду цитологических и биохимических параметров. Мы в наших исследованиях использовали первичные культуры миобластов мыши, что в большей степени соответствует условиям организма.

Отдельно изучено влияние этилметилгидроксипиридина малата на экспрессию мРНК миоаста-

тина. Как показано на диаграмме, сам по себе этилметилгидроксипиридина малат не оказывал влияния на экспрессию миоастатиновой мРНК. Экспрессия миоастатиновой мРНК возрастала при совместном действии обоих реагентов: индоксилсульфата и этилметилгидроксипиридина малата, что оказалось совершенно неожиданным. Через 48 часов их совместного действия она возрастала в 1,87 раза относительно контроля, а через 72 часа – в 2,36 раза. Механизм совместной активации экспрессии мРНК миоастатина индоксилсульфата и этилметилгидроксипиридина малата остается не совсем ясным и требует дальнейшего изучения. В ранее проведенных

исследованиях показано кардио-, церебро- и гепатопротективное действие препарата этилметилгидроксипиридина малата благодаря его антигипоксическому и антиоксидантному действию [18-21]. Компоненты препарата обеспечивают нормализацию окислительно-восстановительных процессов и созданию благоприятного фона для интенсификации обменных процессов.

Выводы

Таким образом, результаты нашего исследования позволяют заключить, что индоксилсульфат обладает значительным цитостатическим действием на миобласты *in vitro*, подавляя их пролиферацию. Можно предположить, что данным свойством индоксилсульфата, в меньшей степени – индукцией экспрессии миостатина, можно объяснить развитие саркопении и кахексии у больных с почечной недостаточностью. Этилметилгидроксипиридина малат, нивелируя токсическое действие индоксилсульфата, опосредованно оказывает протективное влияние на миобласты *in vitro*.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

The authors declare no conflict of interests

Список литературы

1. Cheng T.H., Ma M.C., Liao M.T. et al. Indoxyl Sulfate, a Tubular Toxin, Contributes to the Development of Chronic Kidney Disease. *Toxins*. 2020;12(11):684. <https://doi.org/10.3390/toxins12110684>
2. Смирнов А.В., Голубев Р.В., Коростелева Н.Ю. и др. Снижение физической работоспособности у больных, получающих заместительную почечную терапию: фокус на саркопению. *Нефрология*. 2017; 21(4):9-29. <https://doi.org/10.24884/1561-6274-2017-21-4-9-29>
3. Smirnov A.V., Golubev R.V., Korosteleva N.Y. et al. Decline of physical performance in patients receiving renal replacement therapy: focus on sarcopenia. *Nephrology (Saint-Petersburg)*. 2017;21(4):9-29. (In Russ.) <https://doi.org/10.24884/1561-6274-2017-21-4-9-29>
4. Koyun D., Nergizoglu G., Kir K.M. Evaluation of the relationship between muscle mass and serum myostatin levels in chronic hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl [serial online]* 2018. [cited 2020 Dec 12];29:809-15. Available from: <https://www.sjkdt.org/text.asp?2018/29/4/809/239648>
5. Milanese S., Garibaldi S., Saio M. et al. Indoxyl Sulfate Induces Renal Fibroblast Activation through a Targetable Heat Shock Protein 90-Dependent Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; Article ID 2050183, 11 pages <https://doi.org/10.1155/2019/2050183>
6. Kim H.Y., Yoo T., Hwang Y. et al. Indoxyl sulfate (IS)-mediated immune dysfunction provokes endothelial damage in patients with end-stage renal disease (ESRD). *Sci Rep*. 2017; (7)-3057. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03130-z>
7. Lien H., Roberts M.A., Pope A. et al. Endothelial glycocalyx damage in kidney disease correlates with uremic toxins and endothelial dysfunction. *BMC Nephrol*. 2021;22(1):21. <https://doi.org/10.1186/s12882-020-02219-4>
8. Watanabe K., Tominari T., Hirata M. et al. Indoxyl sulfate, a uremic toxin in chronic kidney disease, suppresses both bone formation and bone resorption. *FEBS Open Bio*; 2017; (7) 1178-1185. doi:10.1002/2211-5463.12258
9. Adesso S., Magnus T., Cuzzocrea S. et al. Indoxyl Sulfate Affects Glial Function Increasing Oxidative Stress and Neuroinflammation in Chronic Kidney Disease: Interaction between Astrocytes and Microglia. *Front. Pharmacol*. 2017;8:370. doi: 10.3389/fphar.2017.00370
10. Rando T.A., Blau H.M. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol*. 1994;125(6):1275-87. doi: 10.1083/jcb.125.6.1275
11. Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986; 22;89(2):271-7. doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6
12. Artaza J.N., Bhasin S., Magee T.R. et al. Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T(1/2) mesenchymal multipotent cells. *Endocrinology*. 2005; 146: 3547-3557. doi: 10.1210/en.2005-0362
13. Mc Pherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997; 387 (6628): 83-90. DOI:10.1038 / 387083a0
14. Baczyk J., Silkiewicz M., Wojszel Z. B. Myostatin as a Biomarker of Muscle Wasting and other Pathologies-State of the Art and Knowledge Gaps. *Nutrients*. 2020;11;12(8):2401. doi: 10.3390/nu12082401
15. Watanabe H., Enoki Y., Maruyama T. Sarcopenia in Chronic Kidney Disease: Factors, Mechanisms, and Therapeutic Interventions. *Biol Pharm Bull*. 2019;42(9):1437-1445. doi: 10.1248/bpb.b19-00513
16. Кузурова А.С., Гасанов М.З., Батюшин М.М. и др. Молекулярные основы мышечного истощения: роль миостатина и протеинкиназы β в прогрессировании белково-энергетической недостаточности у пациентов на гемодиализе. *Архив внутренней медицины*. 2019;9(2):126-132. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2019-9-2-126-132>
17. Кузурова А.С., Гасанов М.З., Батюшин М.М. et al. Molecular bases of muscular definition: the role of myostatin and protein kinase β in progression of protein-energy waste in patients on hemodialysis. *The Russian Archives of Internal Medicine*. 2019;9(2):126-132. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2019-9-2-126-132>
18. Leong S.C., Sirich T.L. Indoxyl Sulfate—Review of Toxicity and Therapeutic Strategies. *Toxins*. 2016; 8 (358): 1-13. doi:10.3390/toxins8120358
19. Enoki Y., Watanabe H., Arake R. et al. Indoxyl sulfate potentiates skeletal muscle atrophy by inducing the oxidative stress-mediated expression of myostatin and atrogen-1. *Sci Reports*. 2016; v.6: 32084. DOI:10,1038 / srep32084
20. Рагулина В.А. Эндотелиопротективные и кардио-

протективные эффекты некоторых производных 3-гидроксипиридина при моделировании эндотоксин-индуцированной модели эндотелиальной дисфункции. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016;6(1):70-73. URL: <https://www.applied-research.ru/ru/article/view?id=9552>

Ragulina V.A. Endothelioprotective and cardioprotective effects of some derivatives of 3-hydroxypyridine in modeling an endothelial dysfunction-induced model of endothelial dysfunction. International Journal of Applied and Basic Research. – 2016; 6 (1): 70-73. URL: <https://www.applied-research.ru/ru/article/view?id=9552>

19. Колесниченко Г.А., Щерблыккина О.В., Нестерова Н.И. и др., Аддитивное нейропротективное действие производных 3-гидроксипиридина и эритропоэтина человека на модели геморрагического инсульта у крыс. Фармация и фармакология. 2020;8(3):169-180. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-3-169-180>

Kolesnichenko P.D., Sheblykina O.V., Nesterova N.I. et al. Additive neuroprotective effect of 3-hydroxypyridine derivatives and human erythropoietin analogue on a hemorrhagic stroke model in rats. Pharmacy & Pharmacology. 2020;8(3):169-180. <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2020-8-3-169-180>

20. Овсянникова О.А., Карпеева Д.В., Осипенко М.Д. Влияние препарата «Этоксидол» на количество эритробластических островков в условиях воздействия серосодержащего газа на разных этапах постнатального онтогенеза. Кубанский научный медицинский вестник. 2017;1 (162): 99-103.

Ovsyannikova O.A., Karpeeva D.V., Osipenko M.D. The influence of the preparation “Etoxidol” on the absolute quantity of erythrocyte islets in the condition of sulfur dioxides impact on the different stages of ontogeny. Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik. 2017; 1(162):99-103.

21. Кукес В.Г., Прокофьев А.Б., Чеча О.А. и др. Влияние антиоксидантов на напряжение кислорода в крови у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 6-1. С. 56-58.

Kukes V.G., Prokofiev A.B., Checha O.A. et al. The effect of antioxidants on oxygen tension in the blood in patients with chronic heart failure. Mezhdunarodny`j zhurnal prikladny`x i fundamental`ny`x issledovanij. 2016; 6(1):56-58.

Дата получения статьи: 26.02.2021

Дата принятия к печати: 28.03.2021

Submitted: 26.02.2021

Accepted: 28.03.2021