

Научный журнал.

Основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий РАМН

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати
Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324
09.06.2005 г.

Подписной индекс 57995 в Каталоге «Издания органов научно-технической информации» ОАО «Роспечать»

Журнал включен в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (редакция – март 2010 года)



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор: Н. Н. Каркищенко,
академик РАН, член-корреспондент РАМН,

Г. Д. Капаназе (к.с.-х.н., зам. главного редактора), В. Н. Каркищенко (д.м.н., проф.), Ю. С. Макляков (д.м.н., проф.), Е. Л. Матвеевко (к.э.н., доц., ответственный секретарь), А. Н. Мурашев (д.б.н., проф.), А. В. Муха (д.м.н., зам. главного редактора), Г. В. Раменская (д.ф.н., проф.), А. О. Ревякин (к.б.н.), Д. В. Сахаров (к.б.н.), Х. Х. Семенов (к.б.н.), Н. В. Станкова (к.б.н.), Д. А. Сычев (д.м.н., проф.), В. В. Хоронько (д.б.н., проф.), Е. В. Ших (д.м.н., проф.)

Редакционный совет:

prof. Hans-W. Ackermann (Канада), prof. Iorgen Backmen (Германия), акад. РАМН и РАСХН В. А. Быков, проф. Витан Влахов (Болгария), акад. РАМН А. М. Дыгай, prof. Ralf Edwards (Швеция), prof. Moineau S.-F. D'Herelle (Канада), акад. РАМН С. И. Колесников, акад. РАМН А. А. Кубатиев, акад. РАМН В. Г. Кукес, prof. Michael Orme (Великобритания), акад. РАН А. И. Мирошников, акад. РАН и РАМН М. А. Пальцев, акад. РАМН В. И. Петров, акад. РАМН К. В. Судаков, prof. Solemene Umberto (Италия), акад. РАМН В. П. Фисенко, член-корр. РАМН Д. Ф. Хритинин, проф. Б. Д. Цыганков, акад. РАМН В. Н. Ярыгин

Охраняется Законом Российской Федерации № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 9 июля 1993 года и иными нормативно-правовыми актами. Воспроизведение всего издания, а равно его части (частей) без письменного разрешения издателя влечет ответственность в порядке, предусмотренном действующим законодательством.

Адрес редакции:

105064, Москва
Малый Казенный пер. 5, стр. 1
matveyenkoel@mail.ru
Тел.: 561-52-64, 917-32-17

Содержание

ОБЗОРЫ

- С. Н. Ларина, И. В. Игнатъев, Н. В. Чебышев, В. Г. Кулес**
Роль ядерных рецепторов в регуляции биотрансформации ксенобиотиков 5

НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

- А. М. Дыгай, Г. Н. Зюзьков, В. В. Жданов, Е. В. Удут, Е. В. Симанина, Т. Ю. Хричкова,
Л. А. Ставрова, Т. В. Андреева, А. В. Чайковский, Е. И. Верещагин, П. Г. Мадонов**
Мобилизация стволовых клеток пегелированным с помощью нанотехнологии гранулоцитарным колониестимулирующим фактором как модель изучения процессов миграции прогениторных элементов 17
- Д.С. Сахаров, Н.Н. Каркищенко, А.А. Филиппов, А.В. Рыжков**
Анализ когерентности ЭЭГ крыс после интраперитонеального введения фторсодержащих производных фуллерена-60 24

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

- О. И. Степанова, О. В. Баранова**
Трансплантация аллогенных клеток костного мозга для коррекции нарушений при пародонтозе на генетических мышах линии BRSUNT 33
- Н. В. Бельская, М. Г. Данилец, Ю. П. Бельский, Е. С. Трофимова, Е. Г. Учасова, О. С. Борсук,
В. И. Агафонов**
Моделирование системной анафилаксии на мышах линии BALb/c 37

МУТАГЕНЕЗ

- Р. А. Гахокидзе, А. Г. Пирцхелани, Н. А. Пирцхелани, Н. Богверадзе, Г. Д. Капанадзе**
Цитотоксическое действие биорага и аммиачной селитры на лабораторных мышей 51

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

- Н. Г. Бердникова, Д. А. Фартух, В. Н. Иванова, В. Г. Сорокин**
Новые клинико-фармакологические подходы к лечению эпидермальных проявлений папилломавирусной инфекции 56
- А. К. Стародубцев, С. П. Федоров, С. Ю. Сереброва, С. Н. Кондратенко, Г. А. Белякова**
Оценка клинической эффективности рабепразола в зависимости от индивидуального типа рецепции париетальных клеток при различных кислотозависимых заболеваниях желудка и двенадцатиперстной кишки 69

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

- Г. Д. Капанадзе, Е. Л. Матвеевко, А. О. Ревякин, С. В. Огнев**
Качественная лабораторная практика (GLP): здания и сооружения Научного центра биомедицинских технологий РАМН 78

Content

REVIEWS

- S. N. Larina, I. V. Ignatiev, N. V. Tchebyshev, V. G. Kukes**
Nuclear receptors in regulation of xenobiotic biotransformation 5

NANOBIOTCHNOLOGIES

- A. M. Dygai, G. N. Zyuzkov, V. V. Zhdanov, E. V. Udut, E. V. Simanina, T. Yu. Khrichkova,
L. A. Stavrova, T. V. Andreeva, A. V. Chaikovskiy, E. I. Vereschagin, P. G. Madonov**
Stem cell mobilization with using granulocyte colonystimulating factor pegilirated by
nanotechnology method as a model of study of progenitor elements migration processes 17
- D. S. Sakharov, N. N. Karkischenko, A. A. Filippov, A. V. Ryjkov**
Analysis of rats EEG coherence after intraperitoneal injection of fluorine-containing fullerenes C₆₀
derivatives.....24

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

- O. I. Stepanova, O. V. Baranova**
The bone marrow cells transplantation for parodontosis correction with genetic mice BRSUNT 33
- N. V. Belska, M. G. Danilets, Y. P. Belsky, E. S. Trophimova, E. G. Utchasova, O. S. Borsuk, V. I. Agaphonov**
Modelling of an anaphylaxis using BALb/c mice 37

MUTAGENESIS

- R. Gakhokidze, A. Pirtskhelani, N. Pirtskhelani, N. Bogveradze, G. Kapanadze**
Investigation of cytotoxic action of ammonium nitrate and biorag on laboratory mice 51

CLINICAL PHARMACOLOGY

- N. G. Berdnikova, D. A. Fartukh, V. N. Ivanova, V. G. Sorokin**
New clinical-pharmacology methods in therapy of epidermal manifestation of human pappiloma viral
skin infection 56
- A. K. Starodubtzev, S. P. Fedorov, S. Yu. Serebrova, S. N. Kondratenko, G. A. Belyakova**
Clinical efficiency of a rabeprazole depending on individual type of gastric parietal cell reception in
patients with different acid-dependent diseases of stomach and duodenum 69

NORMATIVE DOCUMENTS

- G. D. Kapanadze, E. L. Matveenko, A. O. Revyakin, S. V. Ognev**
Good laboratory practice (GLP): buildings of Scientific Center of Biomedical Technologies RAMS ... 78



Уважаемые коллеги!

В новом 2010 году мы рады приветствовать своих читателей и авторов статей. На протяжении всех предыдущих лет мы старались отразить в своем журнале важнейшие события в области биомедицины и биомоделирования, основополагающие вопросы безопасности лекарственных средств, информировать о принятых научно-организационных решениях.

В настоящее время большое количество программ использования лабораторных животных обеспечивает развитие и совершенствование биомоделей, соответствующих физиологическим и патологическим процессам у человека. Животные модели являются достаточно адекватными объектами для понимания болезней человека, но имеются ограничения в научном обосновании соответствия для развития инновационных технологий, оценки токсичности различных веществ фармакодинамики и фармакокинетики новых лекарств. За последний год наблюдается рост числа использованных лабораторных животных во всем мире в связи с их разведением, использованием в фундаментальных биологических исследованиях и процедурах, относящихся к медицине и биологии.

В журнале мы будем продолжать публиковать обзоры и оригинальные статьи по вопросам био- и альтернативного моделирования, по клеточным, молекулярным и нанотехнологиям. Особое внимание будет уделено оригинальным статьям по генетике и разведению животных-моделей и моделей животных, изучению наноматериалов, доклиническому и клиническому изучению лекарственных средств, ксенобиотиков, биологически активных веществ. Мы будем приветствовать работы, касающиеся применения инновационных методов и принципов во врачебной практике, а также статьи, касающиеся регулирования проведения доклинических и клинических исследований по оценке безопасности и эффективности медицинских технологий. Мы надеемся, что пылкий ум экспериментаторов проложит новые пути фармако- и наномоделирования в будущем.

Мы призываем всех к сотрудничеству и надеемся, что журнал и дальше будет заметным явлением в научной биотехнологии.

Ждем Ваших статей и сообщений!

Главный редактор журнала «Биомедицина»,
академик РАН,
член-корреспондент РАН

Н. Н. Каркищенко



Роль ядерных рецепторов в регуляции биотрансформации ксенобиотиков

С. Н. Ларина, И. В. Игнатьев, Н. В. Чебышев, В. Г. Кукес

Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова,
Институт клинической фармакологии ФГУ НЦЭСМП, Москва

Контактная информация: e-mail: elmed@yandex.ru

Изучение генетической регуляции ферментов, участвующих в метаболизме и выведении лекарств и ксенобиотиков, представляет большой интерес для понимания молекулярных механизмов ответа на лекарства. Гидрофобные лиганды и ряд ядерных рецепторов участвуют в индукции различных ферментов и транспортеров I, II и III фазы метаболизма ксенобиотиков. Ядерные рецепторы являются лиганд-активируемыми транскрипционными факторами. Эти белки модулируют регуляцию целевых генов, взаимодействуя с их промоторными или энхансерными последовательностями в специфических участках. Целевыми генами являются ферменты метаболизма, такие как цитохромы P450 (CYP), транспортеры и ядерные рецепторы. Лиганд-активируемые ядерные рецепторы играют важную роль в процессе восприятия токсических веществ, включая лекарства, вещества, загрязняющие окружающую среду и компоненты питания. Ключевым регулятором экспрессии CYP3A, метаболизирующего более 50 процентов лекарств у млекопитающих, является PXR ядерный рецептор. Сравнение аминокислотных последовательностей лиганд-связывающих доменов PXR различных видов животных выявило необычно широкую дивергенцию у ортологических рецепторов. Эти различия объясняют видовую специфичность в индукции P450 под действием различных лекарств.

Ключевые слова: биотрансформация, цитохром P450, ядерные рецепторы, видовые различия.

Изучение генетической регуляции ферментов метаболизма ксенобиотиков и белков-транспортеров является важной и актуальной проблемой молекулярной фармакологии и токсикологии.

За последние годы накоплена информация о структуре и функции генов, кодирующих белки семейства цитохрома P450 [20]. Геномы млекопитающих содержат по меньшей мере 17 семейств таких генов. Члены этих семейств кодируют от 50 до

80 различных белков у разных видов [15]. У человека обнаруживают 57 генов P450 и 19 псевдогенов. Четыре генных семейства, а именно *CYP1*, *CYP2*, *CYP3* и *CYP4*¹, кодируют специфические ферменты печени, которые помимо своих основных эндогенных субстратов метаболизируют практически весь спектр ксенобиотиков (лекарства, токсины и пр.), попадающих в человеческий организм. Данные гены

¹ Поскольку гены и кодируемые ими белки носят одни и те же названия, в тех случаях, когда речь идет о гене, название напечатано курсивом.

имеют сложные и многоуровневые механизмы регуляции. Им свойственна тканеспецифическая экспрессия, регуляция эндогенными гормонами и цитокинами, индукция различными ксенобиотиками. Многие индукторы способны повышать содержание белков суперсемейства цитохрома P450 за счет изменения уровня транскрипции соответствующих генов. Подобная индукция является основным регулятором CYP P450-зависимого метаболизма [2]. Главную роль в биотрансформации ксенобиотиков и лекарственных средств играют члены подсемейства CYP3A. Ферменты, кодируемые генами данной группы, метаболизируют большинство известных лекарственных средств (ЛС).

Значительный прогресс в понимании механизмов индукции ферментов биотрансформации ксенобиотиков и лекарств был достигнут сравнительно недавно, когда была показана важная роль ядерных рецепторов, особенно прегнан X рецептора (PXR) и конститутивного андростанового рецептора (CAR). Эти рецепторы являются членами суперсемейства лиганд-активируемых ядерных транскрипционных факторов. Ядерные рецепторы распознают специфические последовательности в промоторах или энхансерах генов-мишеней и модулируют экспрессию генов, участвующих в биотрансформации.

Индукция ферментов семейства CYP3A

Более 30 лет назад было установлено, что под воздействием ряда токсических агентов, включая синтетический стероид PCN, происходит активация защитного ответа организма, включающая в себя экспрессию определенных изоформ цитохрома P450 [21]. PCN-индуцируемый цитохром был выделен из клеток крыс,

очищен и изучен. Этот фермент значительно отличался от известных на тот момент изоформ цитохрома P450. Анализ ДНК данного белка, получившего название CYP3A23, показал, что он является представителем нового генного семейства [7]. В настоящее время известно, что экспрессия гена CYP3A23 крысы может быть индуцирована широким спектром веществ, включая стероиды, дексаметазон, бетаметазон, гидрокортизон, α -метилпреднизолон, мифепристон, дегидроэпиандростерон, спиронолактон, триацетилолеандомицин (антибиотик), клотримазол, полихлорбифенилы, хлорорганические пестициды, никардипин (антагонист кальциевых каналов), метирапон (ингибитор 11-В-гидроксилазы), фенобарбитал и пр.

У человека гомолог CYP3A23 крысы представлен геном CYP3A4. Его продукт вовлечен в окислительный метаболизм многих веществ, включая большую часть известных ЛС, и в количественном отношении является главным цитохромом, синтезируемым в печени. Индукция данного гена широким спектром ксенобиотиков подтверждена экспериментально. Этот процесс лежит в основе клинически важных лекарственных взаимодействий, а потому привлекает к себе значительное внимание. Хотя первоначально повышение активности CYP3A было выявлено в экспериментах *in vivo*, при воздействии на пациента различных ЛС (дексаметазона, триацетилолеандомицина и рифампицина), большинство индукторов экспрессии гена CYP3A4 выявлено с использованием первичной культуры гепатоцитов человека (*in vitro*) [24]. Одним из наиболее сильных активаторов как «*in vivo*», так и «*in vitro*», оказался макролидный антибиотик рифампицин [14]. Как и в слу-

чае гомологичного гена крысы *CYP3A23*, экспрессия гена *CYP3A4* индуцируется стероидами, включая дексаметазон, спиронолактон и ципротеронацетат [14]. Также индукторами *CYP3A4* являются многие ЛС: клотримазол (фунгицид), фенобарбитал, фенитоин, фенилбутазон, сульфидимидин, омепразол, лансопразол, метирапон и пр. [14].

Принципиально важно, что представители подсемейства *CYP3A* обладают видоспецифичными спектрами индукторов. Например, экспрессия генов *CYP3A4* человека и *CYP3A6* кролика одинаково сильно активируется рифампицином, тогда как ген *CYP3A23* крысы довольно слабо индуцируется этим ЛС [14]. Напротив, *PCN* является эффективным индуктором гена *CYP3A23* крысы, но довольно слабым – для генов *CYP3A4* человека и *CYP3A6* кролика. Эти данные свидетельствуют о существовании важных видоспецифических различий в работе рецепторов, которые в ответ на воздействие ксенобиотиков индуцируют экспрессию генов подсемейства *CYP3A*.

Несмотря на важность цитохрома P450, система биотрансформации и выведения ксенобиотиков, сформировавшаяся в процессе эволюции, включает в себя и белки-транспортеры (АТФ-зависимые мембранные транспортеры), которые «выбрасывают» молекулы токсических веществ из клеток, и ферменты биотрансформации, осуществляющие модификацию липофильных соединений (II фаза метаболизма), приводящую к повышению их гидрофильности и делающую их доступными для мочевой экскреции. Исследования обеих фаз метаболизма ксенобиотиков, а также их экскреции привели к выявлению сложной сети ядерных и стероидных рецепторов, которые обладают общими индук-

торами, сходными ДНК-связывающими доменами и взаимодействуют с одними и теми же генами.

Ядерные рецепторы

За последние десять лет была выявлена целая группа белков (так называемые «орфан»-рецепторы), которые являются важными регуляторами процесса биотрансформации. В их числе: PXR-рецептор (регулирует ряд процессов, протекающих при беременности), CAR-рецептор (участвует в процессе андрогенеза), AhR-рецептор (запускает каскад реакций под воздействием ароматических углеводов), PPAR α -рецептор (триггерный белок-переключатель), GR-рецептор (глюкокортикоидный рецептор), VDR-рецептор (рецептор витамина D) и многие другие. Эти рецепторы синтезируются в различных тканях и органах, участвующих в метаболизме и выведении ксенобиотиков, они обеспечивают молекулярную передачу сигналов непосредственно в клеточное ядро. В ядре такие сигналы (молекулы), взаимодействуя с регуляторными участками соответствующих генов, индуцируют (или модифицируют) их экспрессию.

Ядерные рецепторы обычно характеризуются наличием ДНК-связывающего домена типа «цинковые пальцы» (DBD) и С-концевого лиганд-связывающего домена (LBD). Сравнение аминокислотных последовательностей выявило высокое межвидовое сходство PXR-, CAR- и VDR-рецепторов. В то время как DBD-домены являются высоко консервативными, в структуре LBD-доменов наблюдаются различия, которые, по-видимому, и обеспечивают наблюдаемые видовые особенности метаболизма ксенобиотиков.

Уже изучены основные механизмы индукции экспрессии генов цитох-

ромов P450 ксенобиотиками. Ведущая роль в этих процессах принадлежит трем «орфан»-рецепторам – CAR, PXR и PPAR α (табл. 1), которые участвуют в индукции экспрессии генов, принадлежащих к семействам CYP2, CYP3 и CYP4 [19]. В ответ на воздействие соответствующих сигнальных веществ (фенобарбитал для CAR-рецептора, прегненолон-6 α -карбонитрил и рифампицин для PXR-рецептора и клофибриновая кислота для PPAR α -рецептора) происходит их активация. Все эти рецепторы принадлежат к так называемому семейству ядерных рецепторов 1 (NR1). Они димеризуются с одним и тем же белком – RXR-рецептором. Образующийся комплекс перекрестно взаимодействует с широким спектром прочих внутриклеточных сигнальных систем. Проведенные исследования позволяют предположить, что основ-

ной функцией этих рецепторов является регуляция активности цитохромов P450 в печени, в ответ на воздействие ксенобиотиков или эндогенных метаболитов. Поэтому ксенобиотики в ряде случаев могут вызывать нарушения эндогенной регуляции с соответствующими патофизиологическими последствиями.

Структура PXR-рецептора

Все ядерные рецепторы обладают сходными структурными элементами: высоко вариабельным N-концевым доменом, центральным ДНК-связывающим доменом (DBD) и терминальным С-концевым доменом (LBD), отвечающим за взаимодействие с лигандами [6, 16]. Высоко консервативный DBD-домен состоит из примерно 70 аминокислотных остатков, формирующих два «цинковых пальца». Каждый «цинковый палец» образован че-

Таблица 1

Взаимодействие лигандов с ядерными рецепторами и их действие на ферменты биотрансформации лекарств (Фаза I и II) и ABC транспортеры (Фаза III) [19]

Лиганд	Ядерный рецептор	Распознаваемый ДНК-элемент	Регулируемый ген		
			Фаза 1	Фаза 2	Фаза 3
Ксенобиотики Фенобарбитал	CAR	DR-3, DR-4, DR-5, SR-6, ER-6	CYP2A6(+) CYP2B1(+) CYP2B6(+) CYP2C9(+) CYP2C19(+)	UGT1A1(+)	ABCC2(+) ABCC3(+) ABCC4(+)
Ксенобиотики Стероиды	SXR/PXR	DR-3, DR-4, DR-5, ER-6, ER-8	CYP1A2(+) CYP2B6(+) CYP2C9(+) CYP2C19(+) CYP3A4(+) CYP3A7 CYP7A1(-) CYP3A(+)	SULT2A1(+) UGT1A1(+) UGT1A3(+) UGT1A4(+)	ABCA1(+) ABCB1(+) ABCB11(+) ABCC1(+) ABCC2(+) ABCC3(+) ABCG2(+)
Жирные кислоты Фибраты	PPAR α	DR-1	CYP4A1(+) CYP4A3(+) CYP7A	UGT1A9(+) UGT2B4(+)	ABCA1(+) ABCC2(+) ABCD2(+) ABCD3(+)

тырьмя остатками цистеина, которые связываются с одним атомом цинка. LBD-домен содержит около 250 аминокислот. Его пространственная структура образует своеобразный гидрофобный «карман», в котором происходит связывание лиганда. Помимо этого, LBD-домен также содержит фрагменты, отвечающие за димеризацию, а также участок, активирующий транскрипцию генов-мишеней, так называемую AF-2-спираль (она располагается на самом конце домена) [6]. Когда происходит связывание лиганда, AF-2-спираль претерпевает конформационное изменение. В результате такой активации рецептор способен связываться с соответствующими белками-коактиваторами и инициировать транскрипцию. N-концевой домен ядерных рецепторов высоко вариабелен как по длине, так и по аминокислотному составу.

Для более полного понимания эволюции и биологической функции ядерных рецепторов подобные структуры изучались у различных видов. Проводился анализ гомологии LBD-доменов. Было показано, что все ядерные рецепторы обладают общностью происхождения от некой исходной структуры с последующей эволюционной дивергенцией [18].

Среди млекопитающих идентичность нуклеотидных последовательностей LBD-домена совпадает не более чем на 75%, что является необычно низким значением для ортологичных ядерных рецепторов. Нуклеотидные последовательности, кодирующие LBD-домены ядерных рецепторов курицы и рыбы, имеют 49% и 52% гомологии с аналогичной последовательностью гена *PXR* человека и 54% и 44% гомологии с геном *CAR* человека соответственно. Этот уровень гомологии сопоставим с различиями между самими генами *PXR* и *CAR* у млекопитающих. Построение дендро-

граммы на основании структур LBD-последовательностей показало, что *PXR*-рецепторы обезьяны, свиньи и собаки могут быть выделены в отдельную группу [18]. LBD-домены ядерных рецепторов этих видов показывают наибольшую степень гомологии с LBD-доменом *PXR*-рецептора человека (96%, 87% и 83% соответственно). Это позволяет предположить существование большего сходства в профилях активации *PXR*-рецепторов этих трех видов и человека по сравнению с другими видами животных.

DBD-домены *PXR*-рецепторов млекопитающих высоко консервативны и имеют гомологию аминокислотного состава более 95% [9].

В настоящее время для многих видов показано наличие генетического полиморфизма *PXR*-рецепторов. Различные изоформы возникают при альтернативном сплайсинге либо за счет существования альтернативных промоторов. Например, при сплайсинге внутри рамки считывания, приводящим к делеции 41 аминокислоты с N-конца LBD-домена *PXR*-рецептора мыши образуется изоформа *PXR2*, обладающая более узким диапазоном индукторов [13]. У человека был описан похожий вариант, в котором отсутствуют 37 аминокислот [4]. Второй, относительно редкий вариант *PXR*-рецептора человека, обозначенный *hPAR2*, возникает в результате добавления 39 аминокислот к N-концу *PXR*-рецептора. Пока неизвестно, как такая модификация влияет на его активность.

Недавно была описана структура гена *PXR* человека [8]. Он располагается на 3 хромосоме (локус 3q13-21), состоит из 10 экзонов и 9 интронов и имеет размер около 30 т.п.н. Первые два экзона транскрибируются только при синтезе изоформы *hPAR2*.

Регуляция работы PXR-рецептора

В исследованиях на клеточных моделях было показано, что из всех известных ядерных рецепторов PXR-рецепторы активируются самым широким спектром веществ. PXR-рецепторы человека и макаки резуса имеют сходные профили активации вследствие их высокой гомологии (96%). Профиль активации PXR-рецептора кролика также похож на таковой у приматов, за редким исключением. PXR-рецепторы собаки и свиньи обладают такими же широкими спектрами индукторов, как и PXR-рецепторы других млекопитающих. PXR-рецепторы различных видов животных (за исключением рыб) проявляют высокое сродство не только к ксенобиотикам, но также и к различным стероидам, включая желчные кислоты.

Исследования, проведенные на PXR-рецепторе мыши, показали эффективную активацию как классическим индуктором CYP3A PCN, так и антиглюкокортикоидами [13]. Эти данные позволили предположить, что PXR-рецептор играет важную роль в регуляции активности CYP3A. Между тем, хотя PCN и является эффективным активатором PXR-рецепторов у мышей и крыс, он в значительно меньшей степени способен активировать аналогичные структуры у кролика и человека. Напротив, рифампицин хорошо активирует PXR-рецепторы человека и кролика, но практически не активирует их у мышей и крыс [9]. При этом профили активации PXR-рецепторов пересекаются с профилями индукции CYP3A [9, 14]. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что PXR-рецептор служит ключевым регулятором экспрессии генов семейства CYP3A, а также, что именно особенно-

сти работы PXR-рецепторов определяют профили индукции CYP3A белков.

Спектр веществ, являющихся активаторами PXR-рецептора, постоянно расширяется, в том числе за счет ЛС (табл. 2) [12]. Среди ксенобиотиков, которые активируют PXR-рецепторы, известны такие индукторы системы CYP3A, как метирапон, клотримазол, фенобарбитал, спиронолактон и транснонахлор. Также активаторами PXR-рецепторов являются: нифедипин (блокатор кальциевых каналов), ритонавир (ингибитор ВИЧ протеазы), таксол (цитостатик), тамоксифен и 4-гидрокситамоксифен, троглитазон, ловастатин, дифенол А, диэтилгексилфталат, нонилфенол и пр. [12].

Недавно сообщалось об открытии первого ингибитора PXR-рецептора. Мощный цитостатик эктеинасцидин-743 (ET-743) блокирует его работу (как следствие, прекращается индукция генов CYP3A4 и MDR1) в опытах *in vitro* [22].

Механизм взаимодействия PXR-рецептора с генами-мишенями

Ядерные рецепторы регулируют транскрипцию целевых генов путем связывания со специфическими фрагментами ДНК. Члены подсемейства NR1, которое включает в себя PXR-рецепторы, функционируют в виде гетеродимеров с RXR-рецептором и связываются с участком ДНК, состоящим из двойной последовательности AG(G/T)TCA [15].

Необходимость RXR-рецептора как обязательного партнера димеризации для PXR-рецептора была продемонстрирована в экспериментах *in vitro* на мышах, когда выключение гена RXR приводило к прекращению прохождения сигнала через PXR-рецептор [23]. А воздействие дексаметазона, повышая уровень экспрессии гена RXR человека, приводило

Таблица 2
 Действие лекарств на PXR человека [12]

Лекарственное средство	Терапевтическое применение
Клотримазол	Противогрибковое
Ципротерона ацетат	Антиандрогенное
Дексаметазон	Противовоспалительное
Глутетимид	Седативное
4-Гидрокситамоксифен	Противораковое
Ловастатин	Понижающий уровень холестерина
Метирапон	Для диагностики заболевания
Мифепристон (RU486)	Абортивное
Нифедипин	Антиангинальное
Паклитаксел	Противораковое
Фенобарбитал	Противосудорожное, седативное
Рифампицин	Антибиотики
Ритонавир	Ингибитор протеазы ВИЧ
Гиперфорин	Антидепрессанты
Спиронолактон	Антигипертензивное
Тамоксифен	Противораковое
Троглитазон	Противодиабетическое

к увеличению эффективности работы PXR-рецептора (количество гетеродимеров PXR/RXR возросло). Таким образом, RXR-рецептор играет центральную роль в регуляции многих метаболических путей. Поэтому его можно рассматривать как еще один важный элемент контроля PXR-опосредованной регуляции гена *CYP3A4*, особенно в ситуации, когда концентрация RXR-рецептора является лимитирующим фактором.

Строение опознаваемой последовательности (взаимная ориентация повторов и расстояние между ними) определяет, какие именно гетеродимеры могут с ней связываться. Например, ге-

теродимеры RXR-рецептора с VDR-рецептором, с рецептором тиреоидного гормона и с PXR-рецептором связываются с последовательностью, состоящей из двух прямых повторов со спейсерным участком в 3–5 п.н. [15]. Гетеродимер PXR/RXR также связывается с последовательностью DR-3, входящей в состав промоторов генов *CYP3A23* и *CYP3A2* [20] и в состав энхансера гена *CYP3A4*, а также с последовательностью ER-6 промотора гена *CYP3A4*.

PXR-рецептор способен взаимодействовать с целым рядом регуляторных последовательностей (ER6, DR3 и DR3 и пр.) в генах суперсемейства цитохромов P450 у разных видов.

Кроме последовательностей DR3, DR4 и ER6, гетеродимер PXR/RXR способен связываться с последовательностью DR-5, входящей в состав промоторных областей ряда генов (различные члены семейства *CYP2B* [25], *MDR1* [5]), а также с последовательностью ER-8, расположенной в 5-концевом участке гена *MRP2* [10]. Таким образом, комплекс PXR/RXR способен связываться с регуляторными элементами различного строения. Интересно, что PXR/RXR-комплекс не формируется без активации веществами, которые связываются с RXR-компонентом гетеродимера.

С другой стороны, у крысы ксенобиотики, индуцирующие *CYP3A*, являются также одновременно индукторами и лигандами PXR-рецептора. Предстоит выяснить, является ли этот механизм частным примером или он носит общий характер. Если подобная система регуляции существует и у человека,

она может вызывать различные лекарственные взаимодействия. Например, при комбинированной терапии ВИЧ-инфицированных пациентов ингибиторами ВИЧ-протеазы (ритонавир, субстрат СYP3A4) и противотуберкулезными ЛС (изониазид, рифампицин).

Любопытно также то, что некоторые индукторы СYP3A также являются индукторами гликопротеина Р, кодируемого геном *MDR1*, что объясняют наличием общих регуляторных последовательностей в промоторах данных генов [5].

Генетический полиморфизм PXR-рецептора

Уровень экспрессии *CYP3A4* в печени разных людей может различаться в 50 и более раз, что вызывает значительную индивидуальную вариабельность метаболизма ЛС [10]. Немалая часть этих различий является следствием генетического полиморфизма. Для гена *CYP3A4* на настоящий момент не описано ни одного полиморфного варианта, который бы встречался с частотой, достаточной для объяснения широкой фенотипической вариабельности. Из этого было сделано предположение, что такая вариабельность может быть объяснена полиморфизмом гена *PXR*. Для данного гена уже описано около 40 однонуклеотидных замен, из которых семь приводят к аминокислотным заменам в последовательности белка. Из этих семи замен четыре (R122Q, V140M, D163G и A370T) были ассоциированы с изменением ответа на рифампицин. Однако частота минорного аллеля каждого из этих полиморфизмов была меньше 2%, что также не позволяет использовать их для объяснения широкой фенотипической вариабельности лекарственного метаболизма [12].

Роль PXR-рецептора в биотрансформации ксенобиотиков и лекарств

Идентификация и характеристика PXR-рецептора была важным событием в изучении системы защиты организма от воздействия ксенобиотиков [13]. Экспрессия гена *PXR* индуцируется большим числом эндогенных и экзогенных веществ, включая стероиды, антибиотики, противогрибковые вещества, желчные кислоты и антидепрессанты. Изучение трехмерной структуры LBD-домена PXR-рецептора показало, что он имеет большую сферическую лиганд-связывающую «полость», которая позволяет взаимодействовать с широким спектром гидрофобных веществ. Таким образом, в отличие от других ядерных рецепторов, которые имеют узкий спектр лигандов, PXR-рецептор выступает как общий сенсор для большого количества различных гидрофобных токсинов. PXR-рецептор в составе гетеродимера с рецептором 9-цисретиноевой кислоты (NR2B) взаимодействует с регуляторными районами многих генов, контролирующих метаболизм ксенобиотиков. Опыты на трансгенных мышах подтвердили, что PXR-рецептор является регулятором экспрессии генов семейства *CYP3A* [26]. Поэтому его активация различными ЛС создает молекулярную основу для лекарственных взаимодействий. Исследования, направленные на изучение работы PXR-рецептора, крайне важны при разработке новых ЛС.

Индукция экспрессии *CYP3A4* является основой лекарственного взаимодействия, при котором одно ЛС усиливает метаболизм другого. Большинство ЛС индуцируют *CYP3A4* через активацию PXR-рецептора. К примеру, экстракт зве-

робоя вызывает ускорение метаболизма ЛС, являющихся субстратами CYP3A4 и CYP2C9. Предположительно механизм этого процесса включает в себя участие PXR-рецептора. В опытах *in vitro* экстракт зверобоя действительно активировал PXR-рецептор. Анализ различных компонентов экстракта показал, что повышение активности PXR-рецептора обеспечивалось единственным компонентом – гиперфоринном [17].

Тот факт, что PXR-рецептор является причиной лекарственного взаимодействия, имеет важное фармакологическое значение. Изначально выявление индукторов гена CYP3A4 осуществлялось на поздних стадиях разработки ЛС с использованием первичных культур гепатоцитов человека, поскольку имеющиеся животные модели недостаточно релевантны [1]. Такие тесты требуют больших временных и финансовых затрат, кроме того, их результаты плохо воспроизводятся, если материал берется из различных источников. Поскольку модификация экспрессии гена CYP3A4 происходит через PXR-рецептор, то исследования *in vitro* позволяют относительно быстро и недорого выяснять, взаимодействует ли данное ЛС с PXR-рецептором, причем результаты таких тестов хорошо воспроизводятся. Довольно большой список лекарств-кандидатов может быть быстро протестирован на взаимодействие с PXR-рецептором. В зависимости от результатов одни ЛС могут быть заменены другими, со сходным терапевтическим эффектом, но не взаимодействующими с PXR-рецептором. Например, троглитазон (препарат для терапии сахарного диабета) является сильным антагонистом PXR-рецептора [9]. У человека в случае лекарственно-

го взаимодействия он вызывает резкий гепатотоксический эффект. По этой причине данный препарат был снят с продажи. Аналогичные по своим терапевтическим свойствам пиоглитазон и росиглитазон не взаимодействуют с PXR-рецептором и не проявляют этих вредных эффектов. Тест на взаимодействие с PXR-рецептором также быстро и недорого позволяет проверять препараты растительного происхождения и биодобавки на способность изменять экспрессию CYP3A4.

Связь PXR-рецептора с CAR-рецептором

Наиболее близким к PXR-рецептору является CAR-рецептор. Структуры DBD- и LBD-доменов этих двух рецепторов имеют приблизительно 70% и 50% гомологии соответственно [3]. CAR-рецептор запускает каскад биохимических реакций в ответ на воздействие фенобарбитала.

В неактивном состоянии CAR-рецептор локализуется в цитоплазме [11]. Фенобарбитал активирует CAR-рецептор, способствуя его перемещению в ядро. Интересно, что фенобарбитал не активирует CAR-рецептор путем непосредственного связывания с его LBD-доменом. По-видимому, фенобарбитал воздействует на CAR-рецептор через опосредованный механизм, включающий фосфорилирование, поскольку ингибиторы фосфатазы блокируют его действие [11].

Исходно было показано, что CAR- и PXR-рецепторы контролируют работу генов CYP2B и CYP3A соответственно [13]. Затем было обнаружено, что PXR-рецептор также способен регулировать гены CYP2B [25]. Перекрытие целевых генов для PXR и CAR-рецепторов распространяется не только на семей-

ства *CYP2B* и *CYP3A*. Также происходит совместная регуляция генов семейства *CYP2C*, генов *GST*-семейства, генов, кодирующих сульфотрансферазы, УДФ-глюкуронозилтрансферазы и гена *MRP2* [25]. Все это позволяет предположить наличие своеобразной «функциональной избыточности» сигнальных путей *CAR*- и *PXR*-рецепторов.

PXR- и *CAR*-рецепторы имеют пересекающиеся спектры лигандов, однако у *CAR*-рецептора этот спектр уже, чем у *PXR*-рецептора. Это объясняется предположительно, особенностями строения *LBD*-домена.

Сенсоры ксенобиотиков являются частью сложной сети транскрипционных факторов [21]. Поэтому *PXR* и *CAR*-рецепторы способны в определенной степени компенсировать потерю или дефект функции друг друга, что может объяснить отсутствие четкого и однозначного фенотипа у *PXR*(-) и *CAR*(-) нокаутных мышей.

Выводы и перспективы

В обзоре рассмотрена роль ядерных рецепторов в защите организма от ксенобиотиков. Наибольшее значение имеет *PXR*-рецептор. Он регулирует гены подсемейства *CYP3A*, а также целую группу других генов, экспрессирующихся преимущественно в печени и кишечнике, продукты которых вовлечены в метаболизм и элиминацию потенциально токсичных веществ. Ген *PXR* активируется большим количеством различных веществ, включая ксенобиотики и та-

кие эндогенные метаболиты, как желчные кислоты и стероиды. *PXR*-рецептор является сенсором широкого спектра веществ. Несмотря на то, что данный белок является в некотором смысле «неразборчивым» рецептором, существуют интересные различия в механизме его индукции у различных видов животных. Поскольку основная функция *PXR*-рецептора – защита организма от действия широкого спектра ксенобиотиков, он является причиной осложнений при одновременном применении нескольких лекарственных средств. Установлено, что активация *PXR*-рецептора вызывает целый класс опасных для жизни лекарственных взаимодействий, при которых одно вещество усиливает метаболизм другого. Дальнейшее изучение лигандов данного рецептора позволит открывать новые ЛС, не вызывающие лекарственных взаимодействия. Детальный анализ пространственной структуры *LBD*-домена *PXR*-рецептора может позволить в ближайшем будущем описывать свойства того или иного лекарственного средства еще до того, как оно будет синтезировано и испытано. Это приведет к значительному повышению безопасности в процессе начальных стадий клинических исследований. Изучение гомологичных рецепторов и профилей их активации у различных видов животных позволит выявить наиболее релевантные модели для изучения лекарственных средств *in vivo*.

Список литературы

1. *Barwick J. L., Quattrochi L. C., Mills A. S. et al.* Trans-species gene transfer for analysis of glucocorticoid-inducible transcriptional activation of transiently expressed human *CYP3A4* and rabbit *CYP3A6* in primary cultures

of adult rat and rabbit hepatocytes // *Molecular Pharmacology*. 1996. Vol.50. P. 10–16.

2. *Conney A. H.* // *Cancer Res*. 1982. Vol.42. P. 4875–4917.

3. *Dotzlaw H., Leygue E., Watson P., Murphy L.* The human orphan receptor *PXR* messenger RNA is expressed in both normal and

neoplastic breast tissue // Clin. Cancer Res. 1999. Vol.5. P. 2103–2107.

4. **Elshourbagy N. A., Guzelian P. S.** Separation, purification, and characterization of novel form of hepatic cytochrome P-450 from rats treated with pregnenolone-16 α -carbonitrile // J. Biol. Chem. 1980. Vol.255. P. 1279–1285.

5. **Geick A., Eichelbaum M., Burk O.** Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin // J. Biol. Chem. 2001. Vol.276. P. 14581–14587.

6. **Giguere V.** Orphan nuclear receptors: from gene to function // Endocr. Rev. 1999. Vol.20. P. 689–725.

7. **Hardwick J. P., Gonzalez F. J., Kasper C. B.** Cloning of DNA complementary to cytochrome P-450 induced by pregnenolone-16 α -carbonitrile. Characterization of its mRNA, gene, and induction response // J. Biol. Chem. 1983. Vol.258. P. 10182–10186.

8. **Hustert E., Zibat A., Presecan-Siedel E. et al.** Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYR3A4 // Drug Metab. Dispos. 2001. Vol.29. P. 1454–1459.

9. **Jones S. A., Moore L. B., Shenk J. L. et al.** The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution // Mol. Endocrinol. 2000. Vol.14. P. 27–39.

10. **Kast H. R., Goodwin B., Tarr P. T. et al.** Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor // J. Biol. Chem. 2002. Vol.277. P. 2908–2915.

11. **Kawamoto T., Sueyoshi T., Zelko I. et al.** Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYR2B gene // Mol. Cell Biol. 1999. Vol.19. P. 6318–6322.

12. **Kliwer et al.** // Endocrine Reviews. 2002. Vol.23(5). P. 687–702.

13. **Kliwer S. A., Moore J. T., Wade T. M. et al.** An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway // Cell. 1998. Vol.92. P. 73–82.

14. **Kocarec T. A., Schuetz E. G., Storm S. C. et al.** Comparative analysis of cytochrome

P450A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes // Drug Metab. Dispos. 1995. Vol.23. P. 415–421.

15. **Mangelsdorf D. J., Evans R. M.** The RXR heterodimers and orphan receptors // Cell. 1995. Vol.83. P. 841–850.

16. **Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M. et al.** The nuclear receptor superfamily: the second decade // Cell. 1995. Vol.83. P. 835–839.

17. **Moore L. B., Parks D. J., Jones S. A. et al.** Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands // J. Biol. Chem. 2000. Vol.275. P. 15122–15127.

18. **Moore L.** Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR) and Beuroate Receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of Nuclear Receptor // Mol. Endocrinol. 2002. Vol.16, №5. P. 977–986.

19. **Nakata K., Tanaka Y., Nakano T. et al.** Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II and III xenobiotic metabolizing systems // Drug Metab. Pharmacokinetics. 2006. Vol.21, №6. P. 437–457.

20. **Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T. et al.** // Pharmacogenetics 1996. Vol.6. P. 1–42.

21. **Pascussi J., Jounaidi Y., Drocourt L. et al.** Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A7 promoter gene // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999. Vol.260. P. 377–381.

22. **Synold T. W., Dussault I., Forman B. M.** The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux // Nat. Med. 2001. Vol.7. P. 584–590.

23. **Wan Y. U. Y., An D., Cai Y. et al.** Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver // Molecular and Cellular Biology. 2000. Vol.20. P. 4436–4444.

24. **Watkins P. B., Wrighton S. A., Maurel P., et al.** Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. Vol.82. P. 6310–6314.

25. **Xie W., Barwick J. L., Simon C.M. et al.**

Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR // *Genes Dev.* 2000. Vol.14. P. 3014–3023.

26. Xie W., Barwick J. L., Downes M. *et al.* Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR // *Nature.* 2000. Vol.406. P. 435–439.

Nuclear receptors in regulation of xenobiotic biotransformation

S. N. Larina, I. V. Ignatiev, N. V. Tchebyshev, V. G. Kukes

Studies of genetic regulation processes involved in xenobiotic metabolizing enzymes and drug transporters are of great interest to understand molecular mechanism of drug response. Hydrophobic ligands and several nuclear receptors are involved in the induction of various enzymes and transporters involved in Phase I, II and III xenobiotic metabolizing systems. Nuclear receptors form a family of ligand-activated transcription factors. These proteins modulate the regulation of target genes interacting by promoter or enhancer sequences at specific recognition sites. These target genes include metabolizing enzymes, cytochrome P450 (CYP), transporters and nuclear receptors. Ligand activated nuclear receptors play essential role in sensing of xenobiotic substances including drugs, environment chemical pollutant and nutritional ingredients. PXR is a key regulator of CYP3A expression, metabolizing more 50% prescribed drugs in mammals. Amino acid sequence comparison of the ligand binding domains of different PXR orthologs revealed an unusual high divergence. This divergence explains the species differences observed in P450 induction by different drugs.

Key words: biotransformation, cytochrome P450, nuclear receptors, species differences.



Мобилизация стволовых клеток пегилированным с помощью нанотехнологии гранулоцитарным колониестимулирующим фактором как модель изучения процессов миграции прогениторных элементов

А. М. Дыгай, Г. Н. Зюзьков, В. В. Жданов, Е. В. Удут, Е. В. Симанина, Т. Ю. Хричкова, Л. А. Ставрова, Т. В. Андреева, А. В. Чайковский, Е. И. Верещагин*, П. Г. Мадонов*

НИИ фармакологии СО РАМН, г. Томск

** ООО «Саентифик фьючер менеджмент», г. Новосибирск*

Контактная информация:

НИИ фармакологии СО РАМН, г. Томск 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

** ООО «Саентифик фьючер менеджмент», г. Новосибирск 630056, г. Новосибирск, ул. Софийская, 20*

Предложена новая модель изучения процессов миграции циркулирующих в периферической крови стволовых клеток. Исследована мобилизующая предшественники активность гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), иммобилизованного (имм) на полиэтиленоксиде с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза. Выявлена выраженная способность иммГ-КСФ вызывать выход в кровь костно-мозговых мезенхимальных и кроветворных прогениторных клеток различной степени зрелости. Установлено, что иммГ-КСФ по своей активности превосходит действие неконъюгированного Г-КСФ. Показано наличие специфической активности иммГ-КСФ при его приеме внутрь.

Ключевые слова: стволовые клетки, мобилизация, миграция, иммобилизованный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, нанотехнологии.

Широкое применение в практической медицине получили препараты рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Основными показаниями к его применению являются как самостоятельные заболевания, связанные с нарушением процессов кроветворения, так и миелосупрессивные состояния различного генеза [9, 10]. Кроме того, известно, что Г-КСФ является

эффективным модификатором функций эндогенных стволовых клеток, что определяет его высокую терапевтическую активность при различных распространенных заболеваниях в эксперименте [1, 5, 6, 7]. При этом его эффективность обусловлена способностью вызывать выход прогениторных клеток в кровь, сопровождающуюся, как предполагается, их дальнейшей миграцией и хомингом в органы-мишени.

Тем не менее, применение стандартных форм препаратов Г-КСФ в клинике зачастую ограничено вследствие ряда причин: его токсичности, иммуногенности и др. [8, 16]. В связи с этим представляется актуальным разработка и создание новых препаратов, обладающих специфической активностью в отношении прогениторных клеток различных классов, а также моделей изучения процессов их миграции и перераспределения в организме.

Целью настоящей работы явилось исследование способности препарата Г-КСФ, иммобилизованного (имм) (пегилированного) с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза, вызывать выход в кровь мезенхимальных и кровяных предшественников костного мозга как основа для разработки новой модели изучения миграционных процессов прогениторных элементов.

Методика исследования

Эксперименты были выполнены на 267 мышах линии СВА/СаЛас в возрасте 2-х месяцев, массой 22–24 гр. Животные 1 категории, получены из питомника ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН (сертификат имеется). Стандартный (неконъюгированный) негликозилированный Г-КСФ – аналог филграстима (получен из «ЗАО Сибирский центр фармакологии и биотехнологий», г. Новосибирск) вводили подкожно в дозе по 100 мкг/кг в течение 5 дней. ИммГ-КСФ вводили также в дозе по 100 мкг/кг подкожно в течение 5 дней, и per os в течение 10 дней. Контрольным мышам в аналогичных режимах в эквивалентном объеме (0,2 мл) вводили физиологический раствор.

Препарат иммГ-КСФ был разработан совместно «ЗАО Сибирский центр фармакологии и биотехнологий», ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, НИИ

ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН и НИИ цитологии и генетики СО РАН. При этом иммобилизация молекул негликозилированного Г-КСФ («ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологий», г. Новосибирск) на низкомолекулярном полиэтиленоксиде осуществлялась с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза с применением направленного потока ускоренных электронов [15].

На 2, 3, 4, 5, 7, 10-е сут. эксперимента в костном мозге и периферической крови методом клонирования в полувязкой культуральной среде определяли содержание грануломоноцитарных (ГМ), эритроидных (Э) и фибробластных (Ф) колониеобразующих единиц (КОЕ) [4]. С помощью метода лимитирующих разведений [11] на 3-и сутки опыта в костном мозге и периферической крови изучали количество мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Частоту встречаемости МСК в костном мозге и периферической крови определяли с помощью обобщенной линейной модели для распределения Пуассона [11].

Результаты исследования

В ходе эксперимента у контрольных животных (при курсовом введении физиологического раствора) наблюдалось незначительное увеличение количества КОЕ-ГМ (10-е сут.), КОЕ-Э (7, 10-е) и КОЕ-Ф (7-е сут.) в костном мозге и мало выраженное изменение их содержания в периферической крови (рис. 1, 2). Указанные реакции, очевидно, являлись следствием невротизирующего воздействия

регулярно проводимой процедуры зондирования и были связаны с активацией стресс-реализующих систем организма [1, 3].

Введение препаратов выявило их значительное влияние на состояние пула родоначальных клеток. Г-КСФ как активное вещество исследуемых средств во всех случаях закономерно [9, 10] приводил к увеличению содержания грануломоноцитарных прекурсоров в гемопоэтической ткани. Так, при использовании неконъюгированного Г-КСФ и при внутрижелудочном применении иммобилизованного цитокина отмечалось возрастание количества КОЕ-ГМ на 3, 5, 7-е сут. исследо-

вания. Вместе с тем введение иммГ-КСФ подкожно приводило к более длительному (3, 7, 10-е сут.) и максимально выраженному (до 372,1% на 3-и сут. опыта от аналогичного параметра у контрольных мышей) увеличению числа кроветворных клеток в костном мозге (рис. 1).

В то же время во всех опытных группах имело место развитие феномена мобилизации КОЕ-ГМ. Увеличение числа данных предшественников в периферической крови при парентеральном способе введения препаратов Г-КСФ относительно фона наблюдалось уже на 2-е сут. опыта. Однако повышение их количества, достигающее статистической значимости

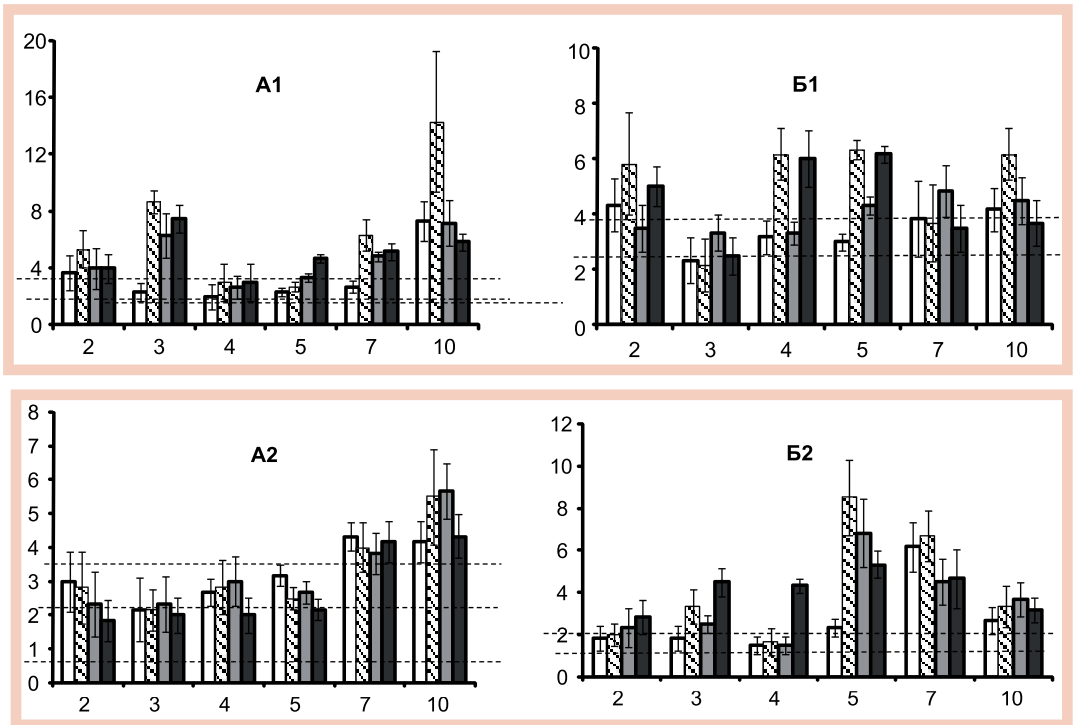


Рис. 1. Содержание КОЕ-ГМ (А) и КОЕ-Э (Б) в костном мозге (индекс-1) и в периферической крови (индекс-2) у мышей линии СВА/Салас при введении физиологического раствора (белые столбики), подкожного введения иммГ-КСФ (заштрихованные столбики), энтерального введения иммГ-КСФ (серые столбики) и при подкожном введении неконъюгированного Г-КСФ (черные столбики).

По оси абсцисс – сроки исследования (сутки), по оси ординат – значения показателя: А – на 10^5 миелокариоцитов; Б – на 10^5 мононуклеаров. Доверительные интервалы при $p < 0,05$. Область межпунктирного пространства – область доверительного интервала значения показателя у интактных мышей при $p < 0,05$

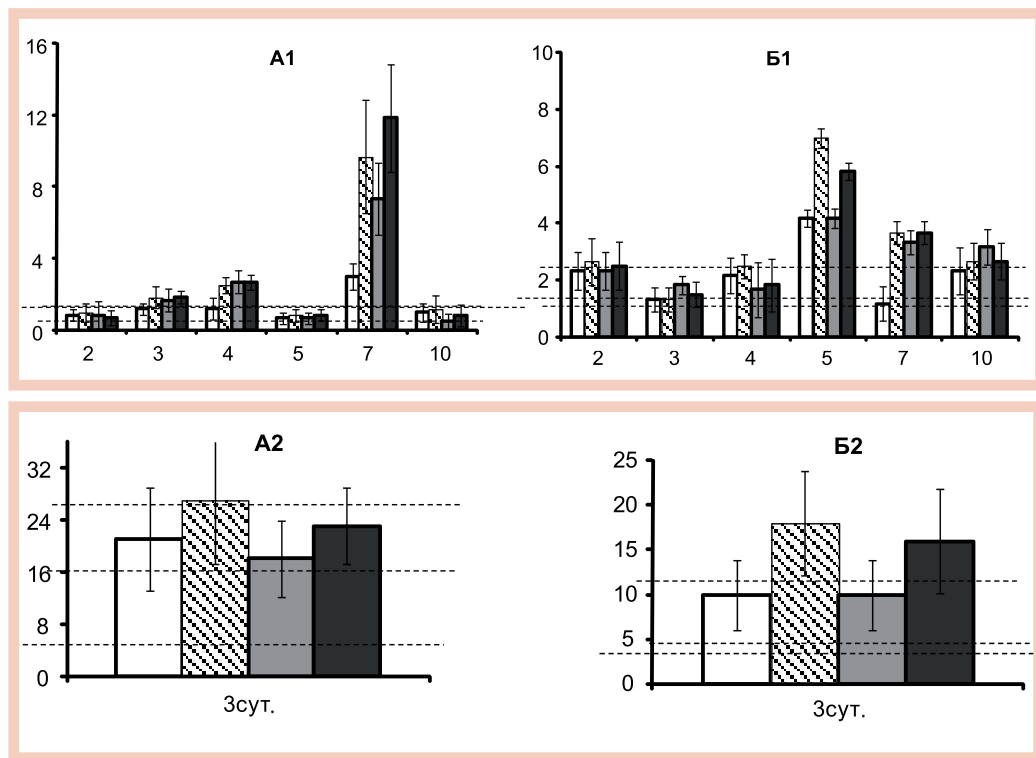


Рис. 2. Содержание КОЕ-Ф (А1) и МСК (А2) в костном мозге и КОЕ-Ф (Б1) и МСК (Б2) в периферической крови у мышей линии СВА/Calas при введении физиологического раствора (белые столбики), подкожного введения иммГ-КСФ (заштрихованные столбики), энтерального введения иммГ-КСФ (серые столбики) и при подкожном введении неконъюгированного Г-КСФ (черные столбики).

По оси абсцисс – сроки исследования (сутки), по оси ординат – значения показателя: А1 – на $2,5 \times 10^5$ миелокариоцитов; Б1 – на $2,5 \times 10^5$ мононуклеаров; А2 – на 10^6 миелокариоцитов; Б2 – на 10^6 мононуклеаров. Доверительные интервалы при $p < 0,05$. Область межпунктирного пространства – область доверительного интервала значения показателя у интактных мышей при $p < 0,05$

по сравнению с контролем, регистрировалось на 4, 5-е и на 4, 5, 10-е сут. при использовании стандартной и конъюгированной формы Г-КСФ соответственно. Причем на 10-е сут. опыта содержание КОЕ-ГМ в крови при применении иммобилизованного Г-КСФ было в 1,7 раза выше, чем при назначении неконъюгированного Г-КСФ. Однако у животных, получавших препарат иммГ-КСФ внутрижелудочно, мобилизация КОЕ-ГМ развивалась в более поздние сроки (5-е сут.) и была менее выражена (рис. 1).

Несколько иные эффекты Г-КСФ наблюдались в отношении эритроидных

прекурсоров. Во всех опытных группах имело место в разной мере выраженное снижение их количества в костном мозге, но только относительно контрольных значений (у животных с достаточно выраженной реакцией стресс-реализующих систем [1, 3]). В то же время наблюдалась значительная стимуляция инфлюкса КОЕ-Э в кровь. Причем, если в начальные сроки (2, 3, 4-е сут.) наибольшее количество циркулирующих КОЕ-Э отмечалось при использовании стандартного Г-КСФ, то в более позднем периоде – при парентеральном введении иммГ-КСФ (5-е сут.) (рис. 1).

Полученные результаты полностью согласуются со сведениями литературы [1, 2, 12, 13], свидетельствующими о стимуляции под влиянием Г-КСФ выхода кроветворных предшественников в периферическую кровь на фоне повышения функциональной активности КОЕ-ГМ.

Во многом схожие изменения имели место со стороны пула фибробластных колониобразующих единиц, содержащих в своем составе как коммитированные стромальные элементы, так и мезенхимальные стволовые клетки [7]. Введение неконъюгированного и иммобилизованного препаратов Г-КСФ (в обоих режимах) приводило к увеличению числа КОЕ-Ф в гемопоэтической ткани на 3, 4, 7-е и 4, 7-е сут. опыта соответственно. При этом прием иммобилизованного с помощью нанотехнологии препарата внутрь оказывал менее выраженный эффект (7-е сут.) по сравнению с парентеральным путем назначения стандартного Г-КСФ. Указанные изменения функциональной активности КОЕ-Ф костного мозга сопровождались усилением их выхода в периферическую кровь. Причем наиболее существенной данная реакция была в группе животных, получавших иммГ-КСФ подкожно, а менее значимая – у мышей при внутрижелудочном применении иммобилизованной формы цитокина (рис. 2).

Изучение содержания истинных родоначальных элементов – мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в костном мозге [1], подтвердило сведения об их низкой способности реагировать на воздействия гуморальных факторов [1, 3]. Назначение исследуемых средств практически не влияло на количественные характеристики

костномозговой популяции МСК. Вместе с тем парентеральное введение различных форм Г-КСФ сопровождалось мобилизацией МСК в периферическую кровь (рис. 2), которая была более выраженной (как и во всех предыдущих случаях) при введении цитокина, связанного с молекулой низкомолекулярного полимера, и реализовывалась, очевидно, опосредованно через активацию элементов микроокружения [1, 2].

Таким образом, Г-КСФ, иммобилизованный с помощью нанотехнологии на полиэтиленоксиде, обладает выраженной способностью вызывать выход прогениторных клеток различных классов в кровь на фоне увеличения популяции грануломоноцитарных и стромальных прекурсоров костного мозга. Причем при парентеральном введении его эффект по ряду показателей, в первую очередь по длительности действия, значительно превосходит аналогичные свойства неконъюгированного Г-КСФ. Полученные результаты соответствуют сведениям литературы о модификации мобилизующего влияния Г-КСФ на стволовые клетки при его пегилировании [12, 13, 14]. В то же время следует отметить впервые в мире выявленную принципиальную возможность энтерального применения препарата на основе колониестимулирующего фактора.

В целом, представленные данные позволяют говорить о перспективности использования иммобилизованного с помощью нанотехнологии электроннолучевого синтеза Г-КСФ с целью изучения процессов перераспределения стволовых клеток в организме.

Список литературы

1. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Зюзьков Г. Н. Гипоксия и система крови. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006. 142 с.

2. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Зюзьков Г. Н. и др. Механизмы мобилизации мезенхимальных клеток-предшественников гранулоцитарным колониестимулирующим

фактором и гиалуронидазой // Бюл. эксперим. биол. и медицины. 2007. №12. С. 652–656.

3. **Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Хлусов И. А.** Роль вегетативной нервной системы в регуляции гемопоэза. Томск: Изд-во ТГУ, 1997. 218 с.

4. **Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Шахов В. П.** Методы культуры ткани в гематологии. Томск: Изд-во ТГУ, 1992. 272 с.

5. **Зюзьков Г. Н., Суслов Н. И., Дыгай А. М. и др.** Роль стволовых клеток в адаптации к гипоксии и механизмы нейропротективного действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. №4. С. 202–208.

6. **Ставрова Л. А., Фомина Т. И., Плотников М. Б. и др.** Фармакологическая регуляция функциональной активности стволовых клеток при восстановлении миокарда в постинфарктном периоде // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. №4. С. 189–193.

7. **Эпштейн О. И., Зюзьков Г. Н., Сотникова Н. В. и др.** Механизмы гепатопротекторного эффекта препарата сверхмалых доз антител к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2005. №4. С. 194–198.

8. **de Wit R., Verweij J., Bontenbal M. et al.** Adverse effect on bone marrow protection of prechemotherapy granulocyte colony-stimulating factor support // J. Natl. Cancer Inst. 1996. Vol.88, №19. P. 1393–1398.

9. **Demetri G. D., Griffin J. D.** Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor // Blood. 1991. Vol.78. P. 2791–2808.

10. **Glaspay J. A.** Hematopoietic management in oncology practice. Part 1. // Myeloid growth factors Oncology (Huntingt). 2003. Vol.17, №11. P. 1593–1603.

11. **Int Anker P. S., Noort W. A., Scherjon S. A. et al.** Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogenous multilineage differentiation potential // Haematologica. 2003. Vol.88. P. 845–852.

12. **Bruns I., Steidl U., Fischer J. et al.** Pegylated granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34+ cells with different stem and progenitor subsets and distinct functional properties in comparison with unconjugated granulocyte colony-stimulating factor // Haematologica. 2008. Vol.93. P. 347–355.

13. **Morris E. S., MacDonald K. P., Hill G. R.** Stem cell mobilization with G-CSF analogs: a rational approach to separate GVHD and GVL? // Blood. 2006. Vol.107. P. 3430–3435.

14. **Steidl U., Fenk R., Bruns I. et al.** Successful transplantation of peripheral blood stem cells mobilized by chemotherapy and a single dose of pegylated G-CSF in patients with multiple myeloma // Bone Marrow Transplant. 2005. Vol.35. P. 33–36.

15. **Vereschagin E. I., Khan Do-Hung, et al.** Radiation Technology in the Preparation of Polyethylene Oxide Hydrophilic Gels and Immobilization of Proteases for Use in Medical Practice // Arch. Pharm. Res. 2001. Vol.24, №3. P. 229–233.

16. **Vial T., Descotes J.** Clinical toxicity of cytokines used as haemopoietic growth factors // Drug Saf. 1995. Vol.13. P. 371–406.

Stem cell mobilization with using granulocyte colony-stimulating factor pegylated by nanotechnology method as a model of study of progenitor elements migration processes

A. M. Dygai, G. N. Zyuzkov, V. V. Zhdanov, E. V. Udut, E. V. Simanina, T. Yu. Khriчkova, L. A. Stavrova, T. V. Andreeva, A. V. Chaikovskiy, E. I. Vereschagin, P. G. Madonov

It has been offered a new model of study of migration processes of stem cells circulating in the peripheral blood. It has been investigated mobilizing of stem cells activity of granulocyte colony-stimulating factor

(G-CSF) immobilized (imm) on polyethylenoxide with the help of electron-beam synthesis nanotechnology. Expressed capacity of immG-CSF to induce migration of mesenchymal and hemopoietic progenitor cells of different maturity degree from the bone marrow in the peripheral blood has been revealed. It has been established, that immG-CSF is more active than unconjugated G-CSF. It has been shown the presence of specific activity of immG-CSF under its ingestion.

Key words: stem cells, mobilization, migration processes, granulocyte colonystimulating factor immobilized, nanotechnologies.

Анализ когерентности ЭЭГ крыс после интраперитонеального введения фторсодержащих производных фуллерена-60

Д. С. Сахаров¹, Н. Н. Каркищенко¹, А. А. Филиппов², А. В. Рыжков²

¹Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

²Российский Научный Центр «Курчатовский институт», Москва

Контактная информация: e-mail: sakharovdm@yandex.ru

Фуллерены и их соединения с другими веществами (фуллеренилы) в будущем могут стать распространенным продуктом нанотехнологии. Поэтому необходимо определить безопасность углеродных наночастиц для человека и окружающей среды. В данной работе мы изучили изменение когерентности электрической активности мозга (Ког ЭАМ) крыс после интраперитонеальной инъекции растворов одного из фуллеренилов: $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$, $C_{60}F(NO_2)$, $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ и $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ в дозе 100 мг/кг. Изменение Ког ЭАМ наблюдалось уже через 3 минуты после инъекции. Главным образом, перестройка когерентных связей происходила в Δ - и θ -диапазонах, реже в полосе 8–45 Гц. После инъекции $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$, $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ и $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ отмечалось снижение Ког ЭАМ в Δ - и θ -диапазонах между различными корковыми областями, во второй половине опыта количество случаев со снижением становилось больше по всем частотным диапазонам. При действии $C_{60}F(NO_2)$ сначала отмечалось небольшое увеличение количества пар с повышением Ког ЭАМ в Δ -диапазоне, в θ -диапазоне Ког ЭАМ снижалась; во второй половине эксперимента наблюдалось снижение Ког ЭАМ в полосе 1–4 Гц, в других частотных диапазонах паттерны ЭЭГ были устойчивы на протяжении часа. Полученные данные еще раз убеждают нас в том, что фуллеренилы проходят через гематоэнцефалический барьер, вызывая быструю реакцию центральной нервной системы, при этом индуцированные эффекты могут сохраняться в течение часа.

Ключевые слова: когерентность электрической активности мозга, интраперитонеальное введение, фторсодержащие производные фуллерена-60, фуллеренилы.

По определению, нанотехнология – это разработка, производство и применение структур, устройств и систем при помощи контроля их формы и размера в интервале диаметров от 1 до 100 нм. Соответственно, наночастицами считают частицы, у которых по крайней мере один размер менее 100 нм по диаметру и которые обладают новыми или улучшенными, зависимыми от размера, свойствами по сравнению с частицами больших размеров из того же материала [12]. Открытая в 1985 г. аллотропная форма углерода – молекула фуллерена C_{60} – имеет форму усеченного икосаэдра диа-

метром около 0,7 нм [5] и также относится к наночастицам. В будущем из-за физико-химических свойств углеродных наночастиц и известных в литературе биологических эффектов, которые они вызывают [6, 8, 13, 14], предполагается применять фуллерены, их соединения с другими атомами или молекулами (фуллеренилы), нанотрубки довольно широко.

В связи с этим необходимо определить степень биобезопасности углеродных наночастиц для человека и окружающей среды. Согласно литературным и нашим данным, центральная нервная система чувствительна к экспозиции

углеродных наночастиц [1, 9, 14], которые могут проникать через клеточную и ядерную мембрану, обнаруживаясь в различных субклеточных структурах, включая ядро [10]. Указывается и на их способность пересекать гематоэнцефалический барьер [13, 15]. В связи с этим необходимо сказать, что существует ряд работ, в которых приводится негативное действие фуллеренов и их производных на ткани живых организмов [2, 11]. До сих пор нам не встретилось исследований, направленных на изучение функционального состояния головного мозга после введения углеродных наночастиц с применением метода электроэнцефалографии (ЭЭГ).

Предыдущая работа [1] была посвящена изучению влияния фторсодержащих производных фуллерена-60 на спектральную мощность электрической активности мозга. В данной работе нам хотелось бы в тех же условиях рассмотреть изменение когерентности ЭЭГ.

Материалы и методы

В наших экспериментах мы применяли следующие фуллеренилы: $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$, $C_{60}F(NO_2)$, растворимые в диметилсульфоксиде (ДМСО) и водорастворимые $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ и $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$. Фуллеренил $C_{60}F_{24}$ получали по реакции $C_{60}Br_{24}$ с XeF_2 в безводном HF при комнатной температуре. В этих условиях атомы брома в полибромфуллерене замещаются на атомы фтора [4]. $C_{60}F_{48}$ синтезировался по реакции KrF_2 с фуллереном C_{60} в безводном HF в течение 48 часов [3]. Синтез фуллеренила $C_{60}F(NO_2)$ осуществляли путем свободнорадикального присоединения к раствору $C_{60}F_{24}$ в неполярных растворителях двуокиси азота; перемешивание осуществляли при пониженной температуре. За ходом реакции следили по прекращению выпадения осад-

ка желтого цвета, который отфильтровывали на бумажном фильтре. Остатки растворителя и непрореагировавшего диоксида азота удаляли в вакууме.

Водорастворимый $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ синтезировали по реакции электрофильного замещения атомов фтора в $C_{60}F_{48}$. К суспензии $C_{60}F_{48}$ в абсолютном бензоле при комнатной температуре добавляли сухой аммиак до полного насыщения, затем фильтровали полученный амин, промывали спиртом, эфиром и высушивали в вакууме. Фторфуллеренпиридинийфторид $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ получали по реакции замещения атомов фтора в $C_{60}F_{24}$ пиридином в воде при повышенной температуре в течение 6–8 часов. По окончании реакции полученный раствор фильтровали, жидкую фазу упаривали. Полученную таким образом четвертичную аммониевую соль промывали спиртом, эфиром и сушили в вакууме.

Эксперименты по влиянию фуллеренилов на пространственно-временную организацию потенциалов мозга проводили на 8 бодрствующих 3-месячных белых крысах линии WAG/GY в хроническом эксперименте. Животных обоего пола, полученных из НЦ БМТ РАМН (Светлые горы), содержали по барьерной системе, в клетках по 3 крысы в каждой со свободным доступом к питью и пище (комбинированный корм, фирма ООО «Лабораторкорм»), микробиологический статус крыс – SPF. Процедура вживления электродов более подробно описана в нашей предыдущей статье [1]. Электроды располагали эпидурально в симметричных точках обоих полушарий, соответствующих корковым зонам: фронтальная (Fp1, Fp2, F3, F4); моторная (C3, C4); теменная (P3, P4). Регистрацию ЭЭГ осуществляли монополярно, рефе-

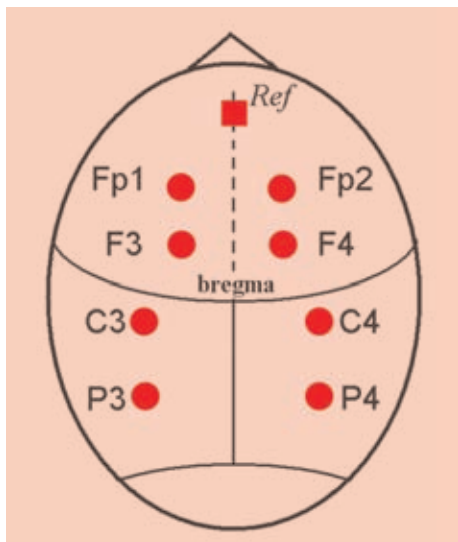


Рис. 1. Схема расположения электродов на черепе крысы, используемая для построения графических карт

рентный электрод (Ref) располагали в носовых костях (рис. 1).

Через неделю после вживления электродов животное помещали в экспериментальную камеру, к электродной шапочке на черепе присоединяли контакты и наблюдали за нативной ЭЭГ в течение 15 минут, при этом крыса могла свободно передвигаться по камере. На следующий день эту процедуру повторяли, но 15 минут регистрировали фоновую ЭЭГ. Далее внутрибрюшинно вводили раствор фуллеренила в дозе 100 мг/кг, спустя 3 минуты регистрировали ЭЭГ в течение 1 часа. В каждом опыте применяли раствор только одного из фторсодержащих производных фуллерена-60. Объем растворителя составлял 2 мл/кг. опыты с одним и тем же животным проводили с интервалом в 5–7 дней. Все манипуляции осуществлялись в соответствии с международными нормами этического обращения с животными. На каждом животном был проведен контрольный опыт, когда вместо раствора фуллерени-

ла вводили только ДМСО необходимого объема.

ЭЭГ регистрировали на электроэнцефалографе-анализаторе ЭЭГА-21/26 «Энцефалан-31-03» (фирма «Медиком МТД», Таганрог). Фильтры высоких частот устанавливали на 70 Гц, постоянная времени составляла 0,3 с, режекторный фильтр устранял колебания частотой 50 Гц. Частота опроса составляла 250 Гц. ЭЭГ после удаления артефактов делили на 32-секундные файлы, таким образом получали число n для каждого опыта. Когерентность электрической активности мозга (Ког ЭАМ) анализировали с помощью пакета программ MatLab-5 в следующих частотных диапазонах: дельта (Δ) – 1–4 Гц; тета (θ) – 4,25–8 Гц; сигма (σ) – 8,25–13 Гц; бета (β) – 13,25–30 Гц; гамма (γ) – 30,25–45 Гц. Эпоха анализа составляла 4 с. Ког ЭАМ была рассмотрена между 12 (6+6) внутрислошарными и 16 межполушарными парами отведений. Исходя из результатов предыдущей работы [1], изменения Ког ЭАМ при действии фуллерена для каждого опыта нормировались либо к фоновым значениям (если фуллеренил водорастворимый), либо к изменениям, полученным после введения ДМСО (если фуллеренил растворяли в ДМСО). Достоверность отличий между выборками для одного опыта по каждому диапазону и отведению оценивали по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни, для группы экспериментов с испытанием одного и того же фуллеренила (при этом суммировали число n для каждого опыта) – по критерию Стьюдента. Принимали во внимание только достоверные изменения Ког ЭАМ ($p < 0,05$), когда среднее значение когерентности было не ниже 0,55 хотя бы в одной из сравниваемых выборок.

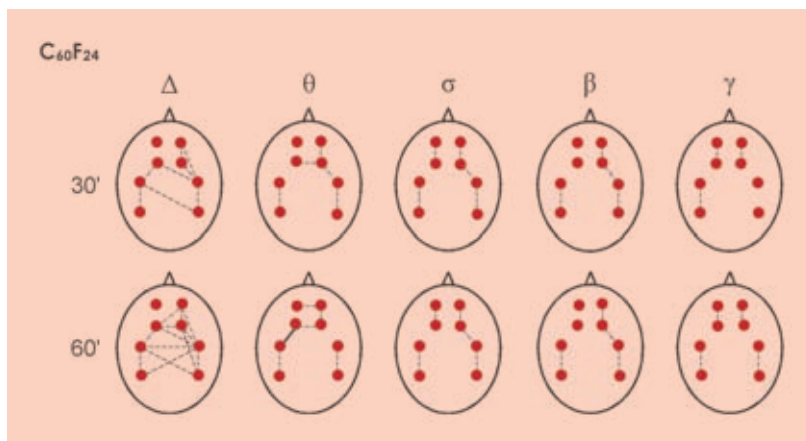


Рис. 2. Изменение КоГ ЭАМ после инъекции фуллеренила $C_{60}F_{24}$ ($n=105$ записей по группе). Верхняя строка – изменения в первые 30 минут после введения вещества, нижняя строка – изменения КоГ ЭАМ во второй половине эксперимента. По горизонтали представлены диапазоны частот. Сплошные линии – достоверное повышение КоГ ЭАМ, пунктирные – достоверное снижение

Результаты

Инъекция растворов фуллеренилов вызывала различные изменения КоГ ЭАМ у животных, эти эффекты хотя и имели некоторые индивидуальные особенности, статистически достоверно образовывали паттерны когерентных связей, характерные для воздействия каждого из веществ.

Так как введение лишь одного ДМСО приводило к значительному снижению КоГ ЭАМ между различными зонами коры в полосе 1–8 Гц, данные при действии фуллеренилов, растворенных в ДМСО, нормировали к действию ДМСО (о чем мы упоминали выше). Перестройка когерентных связей при действии фуллеренилов в основном наблюдалась в низкочастотных диапазонах (1–13 Гц), максимум изменений приходился на Δ -диапазон.

Так, фуллеренил $C_{60}F_{24}$ ($n=105$ записей по группе) (рис. 2) в полосе частот 1–4 Гц вызывал снижение КоГ ЭАМ преимущественно в правом полушарии, спустя 30 минут число пар отведений с уменьше-

нием когерентности возросло, особо выраженным стало уменьшение электрических связей различных областей коры с правой моторной зоной (точка С4). В меньшей степени снижение КоГ ЭАМ было представлено в θ -диапазоне, во второй половине опыта отмечалось даже повышение сочетанности потенциалов между моторной и фронтальной корой левого полушария (F3-C3). В частотной полосе 8–45 Гц имело место локальное снижение внутриполушарной КоГ ЭАМ, это изменение было устойчивым в течение всего эксперимента.

Снижение внутри- и межполушарной КоГ ЭАМ в Δ -диапазоне происходило и после инъекции раствора $C_{60}F_{48}$ ($n=80$ записей по группе) (рис. 3). При этом по сравнению с влиянием $C_{60}F_{24}$ количество пар со снижением было больше сразу после инъекции; спустя 30 минут электрические связи постепенно возвращались к исходному состоянию. В θ - и β -диапазонах (F3-C3), а также в γ -полосе (С4-P4) отмечалось повышение КоГ ЭАМ, имелось небольшое количество пар со снижением соче-

танности потенциалов. Во второй половине эксперимента количество случаев с достоверным изменением Ког ЭАМ уменьшается.

Как и в предыдущей работе [1], когда после введения фуллеренила $C_{60}F(NO_2)_n$ ($n=98$ записей по группе) отмечалось повышение спектра мощности в Δ -диапазоне в правом полушарии, изменение Ког ЭАМ происходило в полосе 1–4 Гц в сторону повышения этого энцефалографического показателя (рис. 4), имелись случаи и со снижением когерентности. Больше всего снижалась Ког ЭАМ в θ -диапазоне, в полосе 13–45 Гц число случаев со снижением сочетанности потенциалов невелико и наблюдается только внутри каждого полушария. Ког ЭАМ во второй половине эксперимента относительно устойчива в полосе 4–45 Гц, а в Δ -диапазоне отмечалось снижение когерентности между многими точками неокортекса, и наиболее выражено это было между моторной зоной правого полушария и другими областями неокортекса (как и во время действия $C_{60}F_{48}$, особенно – $C_{60}F_{24}$).

Влияние водорастворимого ($n=131$ запись по группе) $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ отража-

лось в снижении Ког ЭАМ в Δ -диапазоне (рис. 5). В полосе 4–8 Гц снижение когерентности происходило во фронтальных областях неокортекса. Спустя полчаса число случаев со снижением Ког ЭАМ в Δ -диапазоне значительно увеличилось – дезинтеграция охватывала весь неокортекс. В других диапазонах число случаев со снижением сочетанности потенциалов незначительно увеличилось.

Наконец, при действии фторфуллеренпиридинийфторида $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ ($n=73$ записи по группе) на протяжении часа относительно устойчивыми были снижение Ког ЭАМ по всей коре в Δ -диапазоне, в θ - и σ -диапазонах также наблюдалось снижение когерентности, главным образом во фронтальных областях (рис. 6).

Обсуждение результатов

При введении растворов фуллеренилов перестройка когерентных связей главным образом происходила в Δ - и θ -диапазонах, реже в полосе 8–13 Гц. Изменения при действии $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$, $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ и $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ были в сторону снижения Ког ЭАМ между различными корковыми областями, что,

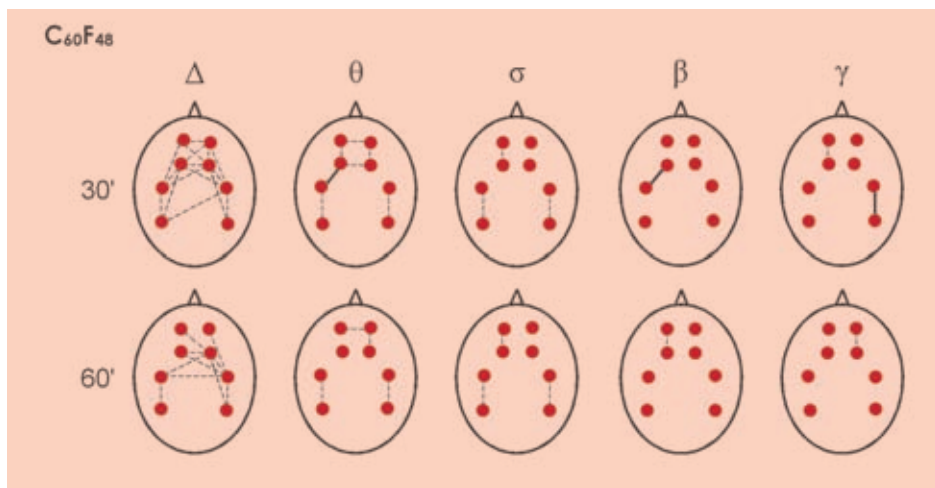


Рис. 3. Ког ЭАМ после введения $C_{60}F_{48}$ ($n=80$ записей по группе). Остальные обозначения, как на рис. 2

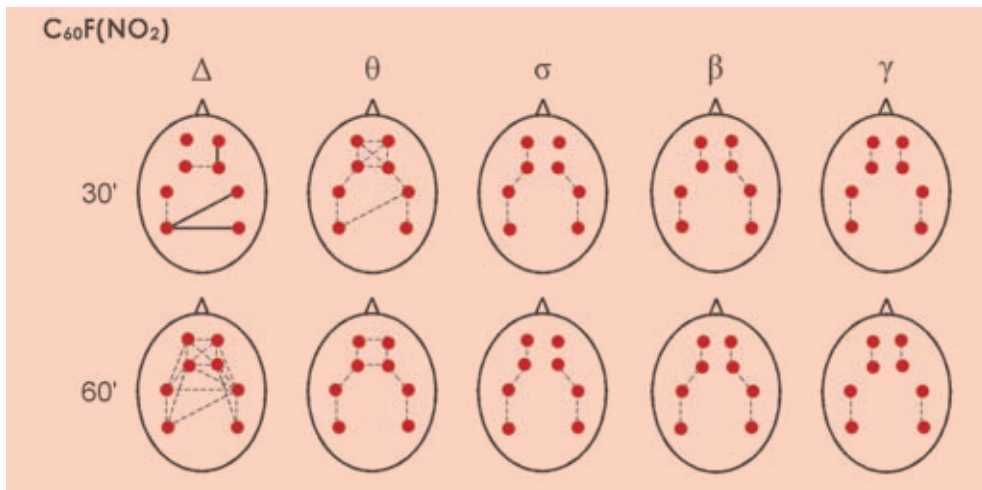


Рис. 4. Изменение КоГ ЭАМ после введения $C_{60}F(NO_2)$, ($n=98$ записей по группе). Остальные обозначения, как на рис. 2

возможно, говорит об образовании множества разных источников осцилляций в мозге. При этом в двух последних случаях степень дезинтеграции между корковыми зонами была более выраженной.

Известно, что распространение по коре Δ -активности у крыс, в частности, происходит во время медленноволнового сна [7], а поскольку эксперименты с крысами проходили в дневное время, когда активность животных снижена (они спят или дремлют), снижение КоГ ЭАМ в полосе 1–4 Гц можно рассматривать именно как показатель повышения уровня функционального состояния. Вместе с тем, снижение КоГ ЭАМ в θ -диапазоне не позволяет нам говорить о наличии в этом случае исследовательского поведения, так как такую форму активности сопровождает распространенное по коре увеличение количества связей в полосе 4–8 Гц, что в свою очередь связано с активацией гиппокампа, который участвует в познавательной деятельности [16]. Пробуждение животного, переход его в состояние возбуждения, активация когнитивной сферы отражается в увеличении связей в высокочастотных диапа-

зонах [7], чего в наших экспериментах не наблюдалось. Поэтому, вероятно, в ответ на действие фуллеренилов возникает особое функциональное состояние, связанное с повышением уровня бодрствования, но одновременно с подавлением целенаправленного, исследовательского поведения. И это состояние было устойчивым на протяжении 60 минут.

Остается не совсем понятной смена функциональных состояний после инъекции фуллеренила $C_{60}F(NO_2)$: сначала отмечалось небольшое увеличение количества пар с повышением КоГ ЭАМ в Δ -диапазоне, случаев со снижением было мало, однако во второй половине эксперимента наблюдались типичные для влияния фуллеренилов изменения – широко представленное по коре снижение сочетанности биопотенциалов. Учитывая то, что мы сравниваем изменения по отношению к влиянию ДМСО, характеризующееся само по себе снижением КоГ ЭАМ в полосе 1–4 Гц, можно утверждать, что по сравнению с фоновыми значениями усиление церебрального взаимодействия незначительно. В этом случае имеет место или длительное сдер-

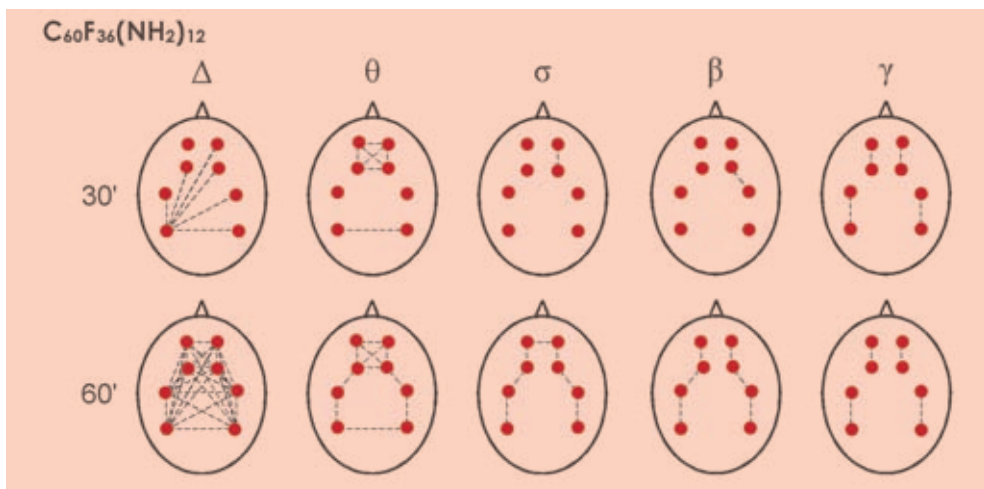


Рис. 5. Ког ЭАМ после инъекции водорастворимого фуллеренила $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ ($n=131$ запись по группе). Остальные обозначения, как на рис. 2

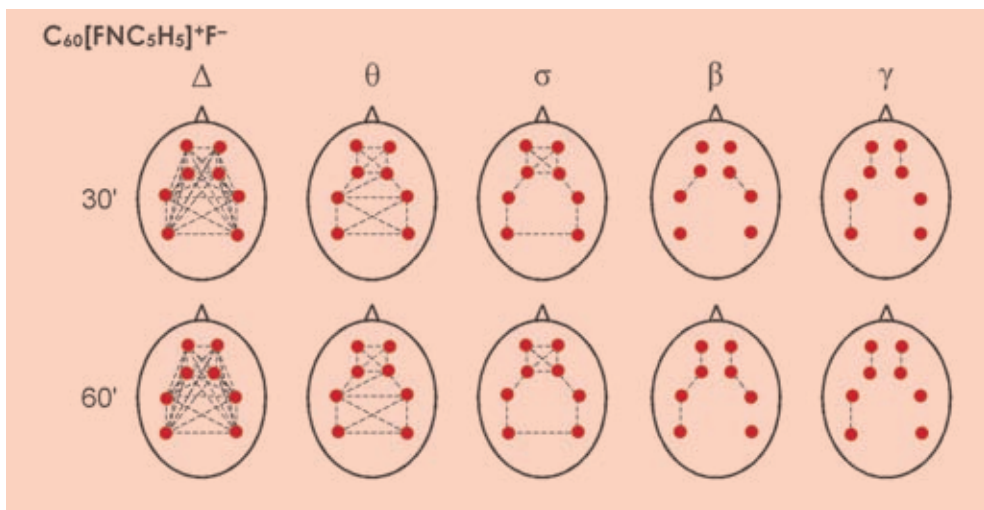


Рис. 6. Ког ЭАМ после введения фторфуллеренилпиридинийфторида $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ ($n=73$ запись по группе). Остальные обозначения, как на рис. 2

живание эффекта, вызванное $C_{60}F(NO_2)$, при котором наличное состояние животных (например, дремота) сохраняется в первой половине эксперимента, после чего наступает некоторая активация, или повышение уровня функционального состояния наступает спустя несколько минут после инъекции, и тогда этот тип реакции специфичен для действия группы $F(NO_2)$, транспортируемой фуллере-

ном С-60. Напомним, что интересные данные при действии этого фуллеренила мы получили и при анализе спектральной мощности электрической активности мозга [1].

Результаты экспериментов еще раз убеждают нас в том, что фуллеренилы, вероятно, проходят гематоэнцефалический барьер, вызывая быструю реакцию

центральной нервной системы, и этот эффект может сохраниться в течение часа, о чем нам позволяют судить наши экспериментальные данные.

Выводы

1. Не только спектральная мощность, но и КоГ ЭАМ меняется при действии фуллеренов, при этом изменения наступают довольно быстро (через 3 минуты после инъекции) и могут сохраняться в течение часа; перестройка когерентных связей главным образом происходила в Δ - и θ -диапазонах, реже в полосе 8–13 Гц.

2. При введении фуллеренилов $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$, $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$ и $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ отмечалось снижение когерентных связей в Δ - и θ -диапазонах между различными корковыми областями, снижение сочетанности потенциалов в полосе 8–45 Гц менее выражено; во второй половине опыта число случаев со снижением сум-

марно по всем частотным диапазонам становилось больше.

3. При действии $C_{60}F(NO_2)$ сначала отмечалось небольшое увеличение количества пар с повышением КоГ ЭАМ в Δ -диапазоне, в θ -диапазоне сочетанность потенциалов снижалась, а в полосе 13–45 Гц число случаев со снижением сочетанности потенциалов невелико и наблюдается только внутри каждого полушария; во второй половине эксперимента наблюдалось снижение сочетанности биопотенциалов в полосе 1–4 Гц, в других частотных диапазонах паттерны ЭЭГ были устойчивы на протяжении часа.

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении работы В. И. Королевой и В. И. Давыдову (Учреждение Российской академии наук Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва).

Список литературы

1. Ruzer L. S., Apte M. G. Наночастицы и нанориск // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. 16, № 1. С. 234–235.
2. Krättschmer W., Fostiropoulos K., Huffman D.R. Dusty Objects in the Universe. Dordrecht: Kluwer, 1990. P. 89.
3. Lyon D. Y., Alvarez P. J. Fullerene water suspension (nC60) exerts antibacterial effects via ROS-independent protein oxidation // Environ Sci Technol. 2008. Vol. 42, № 21. P. 8127–8132.
4. Misirkic M. S., Todorovic-Markovic B. M., Vucicevic L. M., Janjetovic K. D., Jokanovic V. R., Dramicanin M. D., Markovic Z. M., Trajkovic V. S. The protection of cells from nitric oxide-mediated apoptotic death by mechanochemically synthesized fullerene (C(60)) nanoparticles // Biomaterials. 2009. Vol. 30, №12. P. 2319–2328.
5. Selvi B. R., Jagadeesan D., Suma B. S., Nagashankar G., Arif M., Balasubramanyam

K., Eswaramoorthy M., Kundu T. K. Intrinsically fluorescent carbon nanospheres as a nuclear targeting vector: delivery of membrane-impermeable molecule to modulate gene expression in vivo // Nano Lett. 2008. Vol. 8, №10. P. 3182–3188.

6. Yamada T., Jung D. Y., Sawada R., Matsuoka A., Nakaoka R., Tsuchiya T. Effects intracerebral microinjection and intraperitoneal injection of [60]fullerene on brain functions differ in rats // J. Nanosci Nanotechnol. 2008. Vol. 8, №8. P. 3973–3980.

7. Каркищенко Н. Н., Сахаров Д. С., Филиппов А. А., Соколов В. Б. Изменения спектральной мощности ЭЭГ крыс после интраперитонеального введения фторсодержащих производных фуллерена-60 // Биомедицина. 2009. №1. С. 38–48.

8. Podolski I. Y., Podlubnaya Z. A., Kosenko E. A., Mugantseva E. A., Makarova E. G., Marsagishvili L. G., Shpagina M. D., Kamin-

sky Y. G., Andrievsky G. V., Klochkov V. K. Effects of hydrated forms of C₆₀ fullerene on amyloid 1-peptide fibrillization in vitro and performance of the cognitive task // J. Nanosci Nanotechnol. 2007. Vol. 7, № 4–5. P. 1479–1485.

9. Porter A. E., Muller K., Skepper J., Midgley P., Welland M. Uptake of C₆₀ by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: studied by high resolution electron microscopy and electron tomography // Acta Biomater. 2006. Vol. 2, № 4. P. 409–419.

10. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kananishi S., Sueki K., Nakahara H., Enomoto S., Ambe F. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity // Chem. Biol. 1995. Vol. 2, № 6. P. 385–389.

11. Косенко Е. А., Соломадин И. Н., Маров Н. В., Венедиктова Н. И., Погосян А. С., Каминский Ю. Г. Роль гликолиза и антиокислительных ферментов в токсическом действии β-амилоидного пептида Aβ_{25–35} на эритроциты // Биоорг. Химия. 2008. Т. 34, № 5. С. 654–660.

12. Roberts J. E., Wielgus A. R., Boyes W. K., Andley U., Chignell C. F. Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human lens epithelial cells // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2008. Vol. 228, №1. P. 49–58.

13. Dementjev A. P., Bezmelnitsin V. N., Ryjkov A. V., Sokolov V. B. Abstract P-II, Book of Abstracts // Proc. of the 12 European Symposium on Fluorine Chemistry. Berlin, Germany, 1998.

14. Bezmelnitsin V. N., Ryjkov A. V., Sokolov V. B. Abstract P-II, Book of Abstracts // Proc. of the 11 European Symposium on Fluorine Chemistry. Bled, Slovenia // J. Fluor. Chem. 1995. Vol. 58, № 2–3. P. 1–23.

15. Maloney K. J., Cape E. G., Gotman J., Jones B. E. High-frequency γ electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat // Neurosci. 1997. Vol. 76, №2. P. 541–555.

16. Young C. K., McNaughton N. Coupling of theta oscillations between anterior and posterior midline cortex and with the hippocampus in freely behaving rats // Cereb. Cortex. 2009. Vol. 19, №1. P. 24–40.

Analysis of rats EEG coherence after intraperitoneal injection of fluorine-containing fullerenes C₆₀ derivatives

D. S. Sakharov, N. N. Karkischenko, A. A. Filippov, A. V. Ryjkov

In the future fullerenes and their compound with other substances (fullerenyles) can become a widespread product of nanotechnology. Therefore it is necessary to evaluation safety of carbon nanoparticles for a person and environment. In this report we show changes of rats' brain activity electrical coherence (Coh) after an intraperitoneal injection one of fullerenyles solutions: C₆₀F₂₄, C₆₀F₄₈, C₆₀F(NO₂), C₆₀F₃₆(NH₂)₁₂, C₆₀[FNC₅H₅]⁺F⁻ in a dose 100 mg/kg. In a three minutes after an injection the changes of Coh was observed. Mainly reorganization of Coh occurred in Δ and θ bands, in other ones (8–45 Hz) the changes were minor. After injection one of C₆₀F₂₄, C₆₀F₄₈, C₆₀F₃₆(NH₂)₁₂, C₆₀[FNC₅H₅]⁺F⁻ Coh decreased in Δ and θ bands between various cortical areas, in second part of experiment number cases with Coh decrease was more for all frequency bands. After injection C₆₀F(NO₂) Coh increased in Δ frequency band at first, in θ band Coh decreased; in second part of experiment Coh decreased in 1–4 Hz frequency band, in other ones patterns of Coh were relative stable an hour. The obtained data convince us again fullerenyles cross the blood-brain barrier, evoking fast reaction of the central nervous system, thus the induced effects can be stable within an hour.

Key words: coherence of electrical activity of brain, intraperitoneal injection, fluorine-containing fullerene C₆₀ derivatives, fullerenyles.



РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

Трансплантация аллогенных клеток костного мозга для коррекции нарушений при пародонтозе на генетических мышцах линии BRSUNT

О. И. Степанова, О. В. Баранова

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Контактная информация: Степанова Ольга Ивановна, тел.: (495) 561-5264

Изучен клиническими и морфологическими методами положительный терапевтический эффект клеток костного мозга на коррекцию патогенетических нарушений пародонтоза у генетических мышечной линии BRSUNT.

Ключевые слова: пародонтоз, мышцы BRSUNT, клетки костного мозга, трансплантация.

Заболевания пародонта – одна из наиболее распространенных и сложных патологий челюстно-лицевой области. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), функциональные расстройства зубочелюстной системы, обусловленные потерей зубов от заболеваний пародонта, развиваются в 5 раз чаще, чем при осложнениях кариеса [2]. Рост заболеваемости пародонтоза свидетельствует о том, что современная медикаментозная терапия не способна надежно препятствовать возникновению и прогрессированию основных симптомов проявлений пародонтоза. Поэтому разработка новых подходов к лечению пародонтоза остается актуальной проблемой современной медицины.

Целью нашего исследования явилось изучение возможности коррекции патогенетических нарушений пародонтоза с

помощью трансплантации аллогенных клеток костного мозга на экспериментальной генетической модели.

Материалы и методы

Для коррекции основных клинических и морфологических признаков пародонтоза использовали модель генетических мышечной линии BRSUNT – опытная группа (n=30). Эти мыши склонны к ожирению, страдают от желудочных поражений. Заболевание зубов и околозубного пространства (Periodontal disease) наблюдаются у 100% животных [1, 3, 4]. Контрольную группу составили мыши той же линии BRSUNT(n=30) без введения клеток костного мозга (ККМ). В опытной и контрольной группах использовали мышечной в возрасте 6 месяцев после рождения. Для коррекции нарушений пародонтоза у опытных мышечной исполь-

зовали аллогенные клетки (гемопоэтической и стромальной фракций) костного мозга (КМ) от здоровых доноров мышей линии C57BL10. Трансплантацию аллогенных КМ проводили шестикратно, сначала вводили трехкратно с интервалом в 5 дней в количестве 600–750 тыс. гемопоэтических клеток костного мозга (ГПКМ) мононуклеарной фракции, культивированных в течение 5 суток; затем трехкратно (с интервалом в 7 дней) в количестве 120–150 тыс. культивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных (фибробластоподобных) КМ (ММСК КМ). Введение КМ проводили внутривентриально, возраст доноров соответствовал возрасту реципиентов, сроки наблюдений составили 1, 3 и 6 месяцев. В динамике проводили клини-

ческие и гистологические исследования ротовой полости больных животных.

Результаты исследования и обсуждение

После введения аллогенных КМ у мышей BRSUNT наблюдали клиническое и функциональное состояние ротовой полости. У мышей опытной группы слизистая оболочка рта розового цвета, не кровоточит, плотно прилегает к зубам. Десневые сосочки, образуя четкую фестончатость, занимают межзубные промежутки в области шеек зубов. Десна плотная, пародонтальные карманы отсутствуют, а зубы плотно прилегают друг к другу (рис.1, а, в, г, д). Более выраженные положительные клинические результаты были получены через 3 месяца после введения КМ, что было подтверждено



Рис.1. Клиническое состояние зубов и околозубного пространства у мышей BRSUNT после введения культивированных аллогенных клеток костного мозга (ККМ):

а – норма; б – контроль без ККМ; в, г, д – опыт после введения ККМ (в – через 1 мес., г – через 3 мес., д – через 6 мес. после введения ККМ)

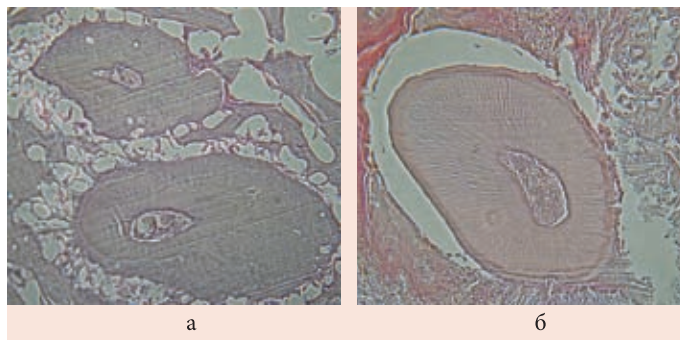


Рис. 2. Образование зубодесневого кармана у контрольных мышей BRSUNT без введения ККМ в разном возрасте; окраска гематоксилин и эозин:

а – в возрасте 6 мес. после рождения, ув. 200; б – в возрасте 9 мес. после рождения, ув. 200

нами гистологически. Позитивная динамика коррекции пародонтита также сохранялась у животных и через 6 месяцев после введения клеток.

Гистологически у контрольных мышей BRSUNT без ККМ в области костной ткани зубной лунки отмечаются дистрофические процессы в виде умеренно-выраженной прогрессирующей гладкой резорбции костной ткани (рис. 2). Отмечается умеренно выраженное истончение костных пластинок межальвеолярных перегородок, расширение костномозговых пространств, так называемое широкопетлистое строение костной ткани, ретракция десны с формированием патологического зубодесневого кармана с расшатыванием зубов (клинически), без признаков воспаления (рис. 1, а). Также отмечалось углубление дна десневой борозды. Более выражен процесс в области рез-

цов. Поражения твердых тканей зуба в виде эрозии эмали и клиновидных дефектов не отмечалось.

При введении культивированных аллогенных стволовых и прогениторных ККМ у опытных мышей BRSUNT отмечались явления эпидермизации десны в области десневой борозды, дно которой у ряда особей определялось на уровне эмалево-цементного соединения, что соответствовало норме, отмечались

признаки очагового ороговения эпителия, что также соответствовало норме (рис. 3). Отмечалось сужение костно-

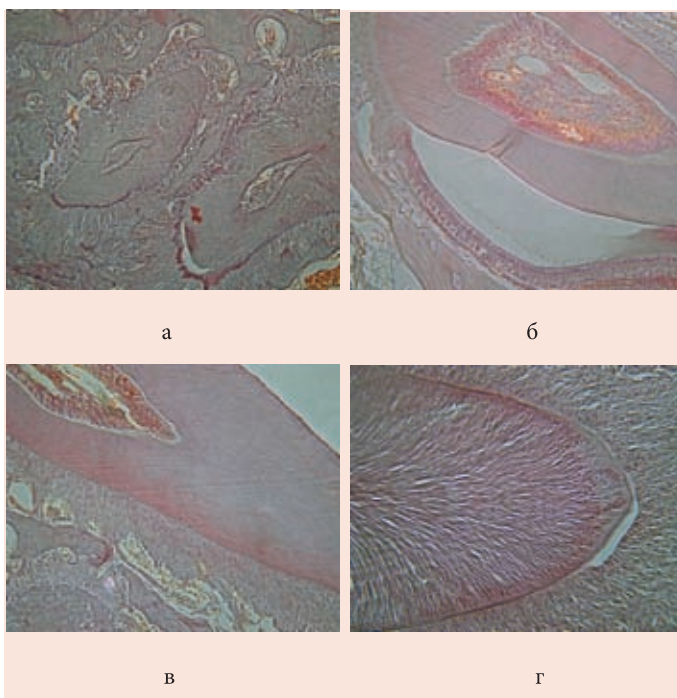


Рис. 3. Опытные мыши BRSUNT после введения ККМ; окраска гематоксилин и эозин.

а, б, в – явления эпидермизации десны в области десневой борозды через 1 мес. после введения ККМ, а, б – ув. 200; в – ув. 400; г – через 3 мес. после введения ККМ, ув. 400

мозговых пространств с частичным замещением зубнодесневого канала пролиферирующими клетками эпителия, уменьшение признаков резорбции костной ткани, возможно связанное с активацией остеобластической функции кости.

Выводы

Мыши линии BRSUNT являются адекватной экспериментальной генетической моделью пародонтоза, так как воспроизводят функциональные и структурные изменения заболевания в челюстно-лицевой области.

Выявлено, что выраженность терапевтического эффекта клеток костного

мозга у мышей с пародонтозом повышается: при использовании культивированных клеток; от кратности введения клеток костного мозга гемопоэтических и стромальных фракций, а сроки проявления терапевтического эффекта зависят от способа введения клеток.

Выраженные позитивные эффекты клеточной терапии у животных с пародонтозом на клинические и морфологические проявления заболевания зубов и околозубного пространства связаны с длительными сроками сохранения жизнеспособности и функциональной активности клеток костного мозга в организме после трансплантации.

Список литературы

1. Бландова З. К., Душкин В. А., Малащенко А. М., Шмидт Е. Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. М: Наука, 1983.
2. Данилевский Н. Ф., Магид Е. А., Мухин Н. А., Миликевич В. Ю. Заболевания пародонта. М: Медицина, 1993.

3. Каркищенко Н. Н. Основы биомоделирования. М: ВПК, 2004.
4. Staats J. Standardized nomenclature for inbred strains of mice: sixth Listing // Cancer Res. 1976. Vol.36. P. 4333–4377.

The bone marrow cells transplantation for parodontosis correction with genetic mice BRSUNT

O. I. Stepanova, O. V. Baranova

Studies of genetic regulation processes involved in xenobiotic metabolizing enzymes and drug transporters are of great intThe evident therapeutic effect of bone marrow cells transplantation for periodontal disease correction was investigated with clinic and morphological methods of analysis. During the experiment the genetic mice BRSUNT were used.

Key words: parodontosis, mice BRSUNT, bone marrow cells, transplantation

Моделирование системной анафилаксии на мышах линии BALb/c

Н. В. Бельская, М. Г. Данилец, Ю. П. Бельский, Е. С. Трофимова,
Е. Г. Учасова, О. С. Борсук, В. И. Агафонов

*Научно-исследовательский институт фармакологии Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук, Томск*

Контактная информация: НИИ фармакологии СО РАМН, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

В данной работе поставлена цель обосновать возможность и показать преимущества моделирования системной анафилаксии на мышах линии BALb/c с использованием овальбумина. Эксперименты были проведены на мышах линии BALb/c в сравнении с мышами C57BL/6. Используются различные режимы и схемы иммунизации овальбумином и проведена оценка степени тяжести анафилактического шока в зависимости от линии животных и схемы иммунизации. Оценена продукция Т-лимфоцитами селезенки цитокинов Th1 и Th2-профиля, а также определено содержание иммуноглобулинов класса Е в сыворотке крови в зависимости от числа иммунизаций. Показано, что результаты анафилактического шока в случае использования лошадиной сыворотки ниже, чем в случае применения овальбумина в качестве антигена. Авторы заключают, что индукция системной анафилаксии с использованием мышей линии BALb/c и овальбумина является добротной, адекватной и экономичной биологической моделью для исследования аллергических (иммуноглобулин-Е-зависимых) заболеваний.

Ключевые слова: анафилаксия; цитокины Th1 и Th2-профиля; иммуноглобулины класса Е.

Заболевания, связанные с патологией иммунной системы, являются важной медико-социальной проблемой современного общества. Наиболее интенсивный рост наблюдается в следующих группах иммунных болезней: аллергические и онкологические заболевания, а также синдром пониженной сопротивляемости организма инфекциям. Несмотря на успехи в области иммунофармакологии и разработки в последние годы рекомбинантных препаратов на основе человеческих цитокинов, индукторов интерферонов и др., проблема остается нерешенной, а указанные патологии, напротив, выходят на первое место в развитых странах и в мире.

Повышение распространенности инфекций, утяжеление протекания некоторых из них (например, туберкулеза),

возрастание лекарственно-устойчивых форм возбудителей, а также появление новых факторов, таких как глобализация, приводящих к усложнению эпидемиологической обстановки, – все это вынуждает мировое сообщество объединять усилия. Примером чего может служить проведение в Российской Федерации программ ВОЗ, три из пяти которых связаны с борьбой с инфекциями [10].

Частота встречаемости онкологических заболеваний неуклонно растет, при этом увеличивается и количество заболевших детей. Так, за последние 30 лет XX века ежегодный статистически значимый прирост данной патологии в странах Европы у детей в возрасте 1–14 лет составил 1%, у подростков 15–19 лет – 1,5% [29].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), частота встречаемости аллергических патологий за последние десятилетия возросла в 2–3 раза; аллергическими заболеваниями страдают около 1–3% взрослого и 10–20% детского населения планеты, а на протяжении жизни аллергические реакции проявляются почти у каждого третьего человека планеты [15].

Известно, что центральное место в регуляции иммунологической реакции принадлежит цитокинам, которые вырабатывают Т-хелперы (Th). Показано, что после дифференцировки и созревания в тимусе наивные Th-прекурсоры мигрируют в периферические органы иммунной системы, где под действием антигена необратимо дифференцируются в два разных типа Th1 или Th2 [27], которые различаются по набору секретируемых цитокинов [20]. Именно от качества поляризации зависят характер течения и итог иммунного ответа. Клинические проявления дисбаланса Th1/Th2 разнообразны и включают как инфекционные, так и неинфекционные патологии: хронические инфекции, аллергические, онкологические, аутоиммунные заболевания. Аллергии и аутоиммунные заболевания связаны с патологически избыточным Th2 либо Th1-типом иммунного ответа соответственно, хронические инфекции и онкологические заболевания сопровождаются недостаточным Th1-типом [12, 17, 21, 24, 25]. Характерными признаками Th1 являются повышенная секреция интерферона- γ , интерлейкина-2, фактора некроза опухоли β , индукция продукции В-клетками антител IgG2a, участие в реакции гиперчувствительности замедленного типа, защита от внутриклеточных паразитов, противоопухолевая активность. Th2-клетки выраба-

тывают интерлейкин-4, интерлейкин-5, интерлейкин-10, преобладают при гельминтозах и аллергиях, способствуют генерации иммуноглобулин-Е-синтезирующих В-клеток, играют важную роль в гуморальном иммунном ответе [13, 20, 28]. Основным фенотипическим признаком Th1 является высокая продукция интерферона- γ , а характерным признаком Th2 – повышенная продукция интерлейкина-4 [5, 22, 26]. Если 1 тип поляризации обеспечивает протективный клеточный иммунитет, то клинические проявления Th2-ответа более разнородны. Это либо реакции гиперчувствительности немедленного типа (анафилактические реакции, бронхиальная астма, гельминтозы), характерными признаками которых являются эозинофилия и повышенный синтез иммуноглобулинов класса E (Ig E), либо состояния толерантности (оральная толерантность, беременность, опухолевый рост), для которых характерна гиперпродукция Т-лимфоцитами трансформирующего фактора роста β и интерлейкина-10 [11, 16].

Среди аллергических заболеваний наиболее распространенными являются иммуноглобулин-Е-зависимые болезни (такие, как бронхиальная астма, атопический бронхит, аллергический ринит, поллиноз, атопическая экзема, атопический конъюнктивит, крапивница). В основе иммунопатогенеза этих заболеваний лежит активация Th2, что приводит к повышенной продукции ряда цитокинов, основной из них – интерлейкин-4, который, в свою очередь, вызывает появление и поддержание на повышенном уровне синтеза иммуноглобулинов класса E [6, 15]. Основными препаратами, используемыми в настоящее время для лечения иммуноглобулин-Е-

зависимых аллергических заболеваний, являются гистаминолитики, представленные блокаторами H_1 -рецепторов и стабилизаторами мембран тучных клеток, а в угрожающих жизни ситуациях (при бронхиальной астме) используются глюкокортикоидные средства [4]. Необходимость в лекарственных средствах, подавляющих эту избыточную активность Th2, для использования в терапии IgE-зависимых патологий достаточно очевидна и широко обсуждается в научной литературе (см., например, обзор [3]). Однако фармакологические средства, которые были бы направлены на основную причину иммуноглобулин-E-зависимых патологий – на коррекцию баланса Th1/Th2, пока не созданы, хотя поиск таких средств является актуальным.

Совершенно очевидно, что поиск и создание такого типа противоаллергических препаратов нового класса невозможен без добротной, адекватной и экономичной биологической модели. С точки зрения целесообразности, наиболее подходящей моделью является системная анафилаксия, поскольку она позволяет дать интегральную оценку аллергенспецифическому Th2-типу иммунного ответа. Действительно, развитие и исход данной реакции охватывает все этапы и звенья патогенеза иммуноглобулин-E-зависимых заболеваний от поляризации иммунного ответа в Th2-тип с последующей гиперпродукцией интерлейкина-4 и иммуноглобулинов класса E, до этапа выброса медиаторов воспаления (таких, как гистамин, серотонин, брадикинин), повышения проницаемости кровеносных сосудов, развития отеков тканей, бронхоспазма, гиперсекреции мокроты в дыхательных путях и других гистохимических изменений, приводящих к угрозе

жизни организма. В методических рекомендациях по доклиническому изучению новых фармакологических веществ для моделирования системной анафилаксии предлагаются морские свинки, а в качестве сенсibiliзирующего агента – лошадиная сыворотка [2]. Однако такой экспериментальный подход обладает рядом существенных недостатков. Морские свинки, во-первых, не экономичны как по стоимости, так и по содержанию. Кроме того, генетически контролируемые морские свинки (линейные) в нашей стране практически не доступны экспериментаторам, а проведение работ на беспородных животных приводит к низкой воспроизводимости результатов и широкому диапазону реакции внутри исследуемых групп. В-третьих, лошадиная сыворотка практически не стандартизуема, ее характеристики могут значительно отличаться партия от партии, что, соответственно, не может не влиять на воспроизводимость результатов анафилактического шока в разных сериях экспериментов.

Всех этих недостатков можно избежать в случае использования линейных мышей и коммерчески стандартизованного антигена. Целью данной работы было обосновать возможность и показать преимущества моделирования системной анафилаксии на мышах линии BALb/c с использованием овальбумина.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на конвенциональных линейных мышах линий C57Bl/6Y (159 голов) и BALb/cY (210 голов). Использованы животные обоего пола в возрасте 8–9 недель, полученные из питомника НИИ фармакологии СО РАМН (1 категория согласно сертификату). Мыши со-

держались в неполной барьерной системе (воздухообмен составлял 10–12 крат/ч, температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность $65 \times 10\%$, световой режим 12:12 ч). Мыши размещались по 4–5 особей в клетках (VELAZ) со стерилизованной мелкой стружкой в качестве подстила, имели постоянный доступ к пище (стерилизованный гранулированный корм) и воде (кипяченая питьевая вода, подкисленная соляной кислотой до pH 4–4,5).

Сенсибилизацию мышей осуществляли подкожным (бедро) введением овальбумина (100 мкг/мышь, «Sigma») с гидроксидом алюминия (5 мг/мышь, «Sigma») в качестве адьюванта в объеме 0,1 мл 1, 2 или 3 раза с интервалом 1 или 2 недели между иммунизациями. Животным контрольной группы вводили по 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Сенсибилизацию мышей линии BALB/cY лошадиной сывороткой проводили, как описано ранее [1]. Разведенную изотоническим раствором хлорида натрия лошадиную сыворотку (1:10) вводили подкожно (в бедро) по 0,2 мл; контрольные животные получали только изотонический раствор хлорида натрия. Интервал между повторными инъекциями составлял 4 дня.

Для получения спленоцитов животных забивали дислокацией шейного отдела позвоночника под легким эфирным наркозом, выделяли селезенку, гомогенизировали ее. Полученную суспензию фильтровали через четырехслойный капрон, трижды промывали холодным изотоническим раствором хлорида натрия, ресуспендировали в культуральной среде (RPMI 1640 («Sigma») с добавлением 10% ЭТС («ICN», «Serva»), 20 мМ HEPES («Sigma»), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанол («Sigma»), 50 мкг/мл гентамицина («Sigma») и 2 мМ L-глутамина («Sigma»)). Жизнеспособность клеток суспензии

оценивали в тесте с 0,1% трипановым синим. В экспериментах использовали суспензии, содержащие не менее 95% жизнеспособных клеток. Клетки культивировали в атмосфере с 5% CO_2 и абсолютной влажности.

Получение супернатантов Т-лимфоцитов для определения продукции цитокинов получали, как описано ранее [30]. Для этого спленоциты культивировали 24 ч в концентрации 5×10^6 клеток/мл в присутствии Т-клеточного митогена (конканавалин А, «Sigma», 4 мкг/мл). Затем клетки удаляли центрифугированием, надосадок разливали на аликвоты и хранили при -20°C .

Определение продукции интерферона- γ Т-клетками в функциональном тесте осуществляли по способности их супернатанта индуцировать выработку оксида азота миелокариоцитами интактных сингенных животных [18]. Супернатант ($\frac{1}{3}$ и $\frac{1}{6}$ от общего объема) Т-лимфоцитов добавляли в 96-луночные круглодонные планшеты («Costar»), содержащие свежeweделенные клетки костного мозга (по $2\text{--}3 \times 10^5$ в лунке), культивировали 48 ч, собирали супернатант и измеряли в нем количество нитритов при помощи реактива Грейса [7]. Реактив (0,1 мл) смешивали с эквивалентным объемом супернатанта и измеряли абсорбцию при длине волны 550 нм. Концентрацию нитритов определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов нитрита натрия.

Определение продукции интерлейкина-2 (ИЛ-2) Т-лимфоцитами осуществляли в функциональном тесте по способности их супернатанта стимулировать пролиферацию ИЛ-2-зависимых спленоцитов [18]. Для получения ИЛ-2-зависимых спленоцитов клетки селезенки

культивировали в концентрации 4×10^6 /мл с конканавалином А (4 мкг/мл) 36 ч, затем отмывали митоген центрифугированием и культивировали 48 ч в круглодонных 96-луночных планшетах (5×10^4 кл/лунку) с различными разведениями исследуемого супернатанта. Затем оценивали пролиферацию клеток радиоизотопным или колориметрическим методом и выражали соответственно в имп/мин или единицах оптической плотности. При использовании радиоизотопного метода за 16 ч до окончания культивирования клеток в лунки вносили по 0,5 мкКю/лунку ^3H -тимидина. Затем содержимое лунок переносили на стекловолокнистые фильтры («Titertek»), промывали изотоническим раствором хлорида натрия, высушивали и переносили в сцинтилляционную жидкость, включение изотопа оценивали на β -счетчике. Оценку пролиферации колориметрическим методом осуществляли как описано ранее [19]. Клетки культивировали 4 суток в круглодонных 96-луночных планшетах ($2-5 \times 10^4$ кл/лунку) в указанных выше условиях. За 4 ч до окончания культивирования в лунки вносили 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (МТТ, «Serva»), концентрация которого в лунках составляла 200 мкг/мл. Затем из лунок удаляли надосадок, а осадок растворяли диметилсульфоксидом (димексид, «Татхимфармпрепараты»). Абсорбцию полученных растворов измеряли при помощи многоканального спектрофотометра («Titertek») при длине волны 550 нм.

Определение количества интерлейкина-4 (ИЛ-4) в исследуемых супернатантах осуществляли твердофазным иммуноферментным методом при помощи тест-систем («Amersham Biosciences») согласно прилагаемым протоколам.

Содержание иммуноглобулинов Е в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом, для чего животных забивали через 7 дней после последней иммунизации, забирали кровь из сердца, получали сыворотку, разливали на аликвоты и хранили при -20°C . Содержание иммуноглобулинов в сыворотках измеряли с использованием соответствующих тест-систем («Immunology Consultants Lab.», США) согласно прилагаемому протоколу.

Общую анафилаксию моделировали, используя иммунизированных овальбумином или лошадиной сывороткой мышей. В ответ на внутривенное введение овальбумина (по 100 мкг в 0,1 мл физиологического раствора хлорида натрия в ретроорбитальный синус) или лошадиной сыворотки (по 0,2 мл неразведенной лошадиной сыворотки в ретроорбитальный синус) у них развивалась анафилактическая реакция. Выделяли следующие степени выраженности:

— 1 (слабая) степень – угнетенное состояние, взъерошенность шерстного покрова,

— 2 (средняя) степень – угнетенное состояние, взъерошенность шерстного покрова, цианоз конечностей, дыхание поверхностное и учащенное, клонические судороги, парезы, параличи,

— 3 (тяжелая) степень – гибель в течение 2–4 ч.

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью программного обеспечения Statistica 6.0. Для каждой выборки вычисляли среднее значение величины признака X и ошибку средней величины m . Проверка гипотезы о равенстве средних проводилась с использованием t -критерия Стьюдента. Вычисленное значение t сравнивали с табличным при заданном уровне зна-

чимости $p < 0,05$. Если расчетная t была больше табличной, то гипотеза о равенстве средних отвергалась.

Результаты

Введение разрешающей дозы антигена животным через 7 дней после однократной иммунизации (табл. 1) вызвало у всех мышей линии BALb/c слабую анафилактическую реакцию (1 степень), что проявлялось в изменении поведения животных (они выглядели угнетенными, вялыми, неподвижными). Указанные изменения появлялись через 5–10 минут после внутривенного введения антигена и наблюдались на протяжении 1–2 ч. Введение разрешающей дозы овальбумина мышам линии BALb/c через 7 дней после второй иммунизации, проведенной с интервалом 1 неделя, вызывало у большинства животных (у 26 из 27) анафилактическую реакцию 1 степени. Анафилактический шок, вызванный у мышей через 7 дней после второй иммунизации

с интервалом 2 недели между инъекциями, был более тяжелый. Все мыши выглядели угнетенными, вялыми, теряли подвижность, их шерстяной покров был взъерошен, конечности цианозны, дыхание поверхностное и учащенное, развивались параличи конечностей, животные принимали боковое положение через 30–40 минут после инъекции. У небольшого количества животных наблюдались клонические судороги, 57% (у 42 из 74) животных погибли в течение 2–4 ч. Еще более тяжелым был анафилактический шок у трехкратно иммунизированных мышей. В этом случае смертность составила 93% (54 из 58 животных).

У мышей линии C57BL/6 при тех же режимах иммунизации выраженность анафилактической реакции была слабее. Если у всех мышей линии BALb/c после однократной иммунизации реакция была 1 степени, то у 40% животных линии C57BL/6 ее вообще не было. Отсут-

Таблица 1

Выраженность анафилактической реакции у мышей линий BALb/c и C57BL/6, сенсibilизированных одно-, двух- или трехкратным введением овальбумина (7 дней после последней иммунизации)

Линия мышей	Выраженность реакции	Однократная иммунизация		Двукратная иммунизация с интервалом 1 неделя		Двукратная иммунизация с интервалом 2 недели		Трехкратная иммунизация с интервалом 2 недели	
		абс. к-во	%	абс.к-во	%	абс. к-во	%	абс. к-во	%
BALb/c	Всего мышей	15	100,0	27	100,0	74	100,0	58	100,0
	нет реакции	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	1 степень	15	100,0	26	96,3	0	0,0	0	0,0
	2 степень	0	0,0	1	3,7	32	43,2	4	6,9
	3 степень	0	0,0	0	0,0	42	56,8	54	93,1
C57BL/6	Всего мышей	15	100,0	24	100,0	69	100,0	51	100,0
	нет реакции	6	40,0	9	37,5	0	0,0	0	0,0
	1 степень	9	60,0	15	62,5	10	14,5	0	0,0
	2 степень	0	0,0	0	0,0	53	76,8	30	58,8
	3 степень	0	0,0	0	0,0	6	8,7	21	41,2

Продукция ИФ-γ (концентрация нитритов, мкМ) и ИЛ-2 (включение ³H-тимидина, имп/мин или оптическая плотность) Т-лимфоцитами селезенки мышей линии BALb/c, сенсibilизированных одно-, двух- или трехкратным введением овальбумина с интервалом 2 недели между иммунизациями (X±m)

Количество иммунизаций	Сроки после последней иммунизации, дни	Разведение исследуемого супернатанта	ИФ-γ			ИЛ-2		
			контроль	опыт		контроль	опыт	
			концентрация нитритов, мкМ	концентрация нитритов, мкМ	% от контроля	включение ³ H-тимидина (имп/мин) ^а или оптическая плотность ^б	включение ³ H-тимидина (имп/мин) ^а или оптическая плотность ^б	% от контроля
1	7	1/6 1/3	6,1±0,8 9,6±1,1	5,8±0,7 8,6±0,8	95,3 89,7	^а 12600 ±1144 8532 ±1484	^а 14063±1210 9246 ± 994	108,4 111,6
	14	1/6 1/3	10,1±1,9 16,3±2,9	9,5±1,6 17,2±2,1	94,4 105,5	^б 0,268 ±0,018 0,397 ± 0,018	^б 0,236 ±0,015 0,377±0,017	88,2 94,9
2	7	1/6 1/3	15,1±0,9 21,5±1,5	10,5±1,3* 16,1±1,0*	69,7 74,9	^б 0,347 ±0,014 0,439 ± 0,017	^б 0,296 ± 0,007* 0,348 ±0,022*	85,3 79,4
	14	1/6 1/3	12,2±1,2 20,6±1,4	7,6 ±1,1* 14,9 ±0,8*	62,0 72,4	^б 0,379 ±0,017 0,525 ±0,038	^б 0,267 ± 0,035* 0,393 ±0,019*	70,5 74,8
3	7	1/6 1/3	8,0±0,6 12,7±0,4	<2 3,0 ± 0,8*	– 24,0	^а 16361 ±2915 23174 ± 2490	^а 5334 ± 1251* 1270±1751*	32,6 54,8
	14	1/6 1/3	12,3±0,8 17,9±1,8	<2 6,4±1,2*	– 35,7	^б 0,282 ±0,010 0,396 ±0,033	^б 0,171 ±0,016* 0,243 ±0,005*	60,6 61,5

Примечание: * – различия с контролем достоверны (p<0,05), n=6

ствовала реакция и у 37,5% дважды иммунизированных мышей линии C57BL/6 (интервал между иммунизациями 1 неделя), в то время как у всех мышей линии BALb/c при аналогичной схеме иммунизации реакция была. У значительной части (76,8%) двукратно иммунизированных животных линии C57BL/6 (интервал между инъекциями овальбумина 2 недели) наблюдался анафилактический шок средней степени, и только 8,7% мышей погибли (среди мышей линии BALb/c смертность составила 56,8%). Среди

трижды иммунизированных мышей линии C57BL/6 смертность от шока составила 41,2%, а у аналогично подготовленных мышей линии BALb/c – 93,1%.

Результаты исследования продукции основных цитокинов Th1-профиля представлены в табл. 2. После однократной иммунизации овальбумином с гидроокисью алюминия мышей линии BALb/c как через 7, так и через 14 дней после введения достоверных изменений в количестве продуцируемого интерферона-γ (ИФ-γ) и ИЛ-2 не наблюдалось. Двукратная им-

Таблица 3

Продукция ИЛ-4 Т-лимфоцитами селезенки трижды иммунизированных овалбумином мышей линии BALb/c (7 дней после последней инъекции) ($X \pm m$)

Контроль (интактные животные)	Опыт (иммунизированные животные)	
концентрация ИЛ-4 (пг/мл)	концентрация ИЛ-4, пг/мл	% от контроля
163,1±14,0	282,7±18,6*	173,3

Примечание: * – различия с контролем достоверны ($p < 0,05$), $n=6$

Таблица 4

Содержание иммуноглобулинов класса E (IgE) в сыворотке крови иммунизированных овалбумином мышей линии BALb/c ($X \pm m$)

Количество иммунизаций	Содержание IgE, мкг/мл
– (контроль)	2,74±0,46
1	4,90±0,64*
2	7,36±0,81*

Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p < 0,05$, $n=6$

мунизация овалбумином приводила к снижению выработки ИФ-γ: через 7 дней после второй иммунизации до 69,7% и 74,9% от контроля при разведениях исследуемого супернатанта $1/3$ и $1/6$ ($p < 0,05$) и через 14 дней после второго введения овалбумина – до 62,0% и 72,4% от контроля при разведениях исследуемого супернатанта $1/3$ и $1/6$ ($p < 0,05$). Так же достоверно ($p < 0,05$) снижалась продукция ИЛ-2: до 85,3% и 79,4% от контрольного уровня через 7 дней после последней инъекции; до 70,5% и 74,8% от контроля через 14 дней. Через 7 дней после третьей иммунизации при использовании супернатанта в разведении $1/6$ уровень нитритов был не детектабелен, что свидетельствовало о незначительном содержании в супернатанте ИФ-γ. При разведении $1/3$ некоторое количество данного цитокина определялось и составляло 24% от контроля ($p < 0,05$). В эти же сроки (7 дней после третьей иммунизации) наблюдалось падение выработки ИЛ-2: до 32,6% и 54,8% от контрольных значений (в разведениях супернатанта $1/6$ и $1/3$ соответственно; $p < 0,05$). Через 14 дней после третьей

Таблица 5

Продукция ИФ-γ (концентрация нитритов, мкМ) и ИЛ-2 (включение 3H -тимидина, имп/мин) Т-лимфоцитами селезенки мышей линии BALb/c, сенсibilизированных лошадиной сывороткой ($X \pm m$)

Количество иммунизаций	Сроки после последней иммунизации	ИФ-γ			ИЛ-2		
		контроль	опыт		контроль	опыт	
		концентрация нитритов, мкМ	концентрация нитритов, мкМ	% от контроля	включение 3H -тимидина, имп/мин	включение 3H -тимидина, имп/мин	% от контроля
1	7	13,8±1,0	15,1±0,7	109,2	20956±1194	20612±1271	98,4
5	3	12,5±0,8	5,2±0,8*	41,8	16878±1545	6710±1069*	39,8
	7	15,8±0,6	5,7±0,7*	35,8	14649±1779	7298±402*	49,8

Примечание: * – различие с контролем достоверны ($p < 0,05$), $n=6$; разведение исследуемого супернатанта составляло $1/3$

Смертность мышей линии BALb/c, иммунизированных лошадиной сывороткой (пятикратное введение) или овалбумином (двукратное введение), в результате анафилактического шока, вызванного через 7 дней после последней иммунизации

Серия эксперимента	Количество животных		Доля погибших мышей, % от контроля
	всего	погибших	
Иммунизация лошадиной сывороткой			
1	12	2	17
2	12	5	42
3	10	5	50
4	11	10	91
5	12	12	100
Иммунизация овалбумином			
1	9	3	33
2	10	4	40
3	10	5	50
4	10	5	50
5	12	7	58

Примечание: все эксперименты были проведены в осенне-зимний период в разные годы

сенсibilизирующей инъекции супернатант в разведении $1/6$ не стимулировал продукцию оксида азота, что говорит о незначительном содержании в нем ИФ- γ . При разведении $1/3$ ИФ- γ определялся, его количество составляло 35,7% от контрольного уровня ($p < 0,05$). В эти же сроки содержание ИЛ-2 составляло около 60% от контрольных значений в обоих разведениях супернатанта ($p < 0,05$).

Определение содержания ИЛ-4 в супернатантах, полученных от трижды иммунизированных мышей линии BALb/c (7 дней после последнего введения овалбумина), показало (табл. 3) значительное увеличение содержания данного цитокина – 173% от контрольного уровня.

Содержание иммуноглобулинов класса E в сыворотке крови мышей линии BALb/c, иммунизированных овалбумином, закономерно увеличивалось (табл. 4). Так, у однократно иммунизированных животных

его количество в 1,8 раза превышало контрольный уровень, у двукратно иммунизированных содержание иммуноглобулинов E в 2,7 раза превосходило показатели интактных мышей.

Многokратные сенсibilизирующие введения лошадиной сыворотки мышам линии BALb/c приводили к снижению продукции T-лимфоцитами селезенки цитокинов Th1 профиля (табл. 5). При этом показатели, полученные через 3 и 7 дней после последней иммунизации, мало различались между собой: снижение вырабатываемого лимфоцитами ИФ- γ составляло 41,8% и 35,8% от контроля (3 и 7 сутки соответственно), а уровень ИЛ-2 достигал 39,8% и 49,8% от контроля (3 и 7 сутки соответственно). Однократная инъекция лошадиной сыворотки не вызывала какого-либо изменения в количестве вырабатываемых

T-лимфоцитами исследуемых цитокинов.

Смертность мышей линии BALB/c от анафилактического шока при пятикратном введении лошадиной сыворотки составляла в разных сериях 17, 42, 50, 91, 100%, что сопоставимо с показателями в группах двукратно иммунизированных овалальбумином мышей с интервалом между иммунизациями 2 недели – 33, 40, 50, 50, 58% (в таблице 6 приведены результаты 5 серий экспериментов для каждой из сенсibilизирующих схем). Доля животных, погибших после введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки, колебалась от 17% до 100% в зависимости от серии экспериментов, в то время как процент смертности среди мышей, получавших овалальбумин, находился в диапазоне 33–58%.

Обсуждение результатов

Анафилаксия представляет собой одну из типичных иммунологических реакций, обусловленных поляризацией 2 типа. В качестве стандартного антигена, вызывающего данный вид поляризации, общепринятым является овалальбумин, который используется чаще всего с гидроокисью алюминия в качестве адъюванта [23]. В своей работе мы сравнили тяжесть анафилактического шока, вызванного у мышей линии BALB/c, после одно-, двух- и трехкратной иммунизации (см. табл. 1). Кроме того, сравнили выраженность реакции при разных схемах в случае двукратной иммунизации: одна из них проводилась с интервалом 1 неделя между инъекциями, а другая – с двухнедельным интервалом. Оказалось, что анафилактический шок происходил даже после однократного введения овалальбумина, однако при увеличении количества сенсibilизирующих инъ-

екций тяжесть шока нарастала, достигая максимальных значений у трехкратно иммунизированных животных – 93% погибших мышей. Интересно, что выраженность анафилактического шока у двукратно иммунизированных животных значительно зависела от интервала между сенсibilизирующими введениями овалальбумина: практически все мыши (96%), иммунизированные с однонедельным интервалом, имели 1 степень тяжести шока, в то время как животные, иммунизированные с интервалом 2 недели, проявляли вторую (43%) и третью (57%) степень тяжести. Если при первой схеме гибели не наблюдалось, то при удлиненном интервале между инъекциями от шока погибали около половины мышей. Полученные результаты позволяют заключить, что оптимальной схемой подготовки животных к анафилактическому шоку является двух- или трехкратные иммунизации с интервалом 2 недели между инъекциями. Причем, двукратная схема пригодна для выявления веществ, способных как повышать, так и снижать выраженность Th2-зависимого иммунного ответа. Трехкратная схема, на наш взгляд, лучше соответствует цели выявить вещества с противоаллергическим действием.

Хорошо известно, что направление поляризации может зависеть не только от антигена, способа его попадания в организм, но и от генотипа. Показано, что линии мышей B10.D2, C57BL/6 и BALB/c в ответ на один и тот же стимул развивают разные типы иммунного ответа: B10.D2 и C57BL/6 склонны развивать Th1-зависимый клеточный ответ, связанный с высоким уровнем ИФ- γ , низким ИЛ-4, в то время как BALB/c – Th2-зависимый с высокой продукцией ИЛ-4 и низкой секрецией ИФ- γ [8, 9, 14]. Нам было интересно, возможно ли вызвать системную

анафилаксию у мышей линии C57BL/6, а также сравнить степень тяжести анафилактического шока у животных линий C57BL/6 и BALB/c (табл. 1). У почти половины (40%) однократно иммунизированных мышей линии C57BL/6, в отличие от BALB/c, анафилактическая реакция не выявлялась. У 63% двукратно сенсibilизированных мышей линии C57BL/6 реакция была 1 степени, в то время как почти у всех (96%) мышей линии BALB/c эта степень наблюдалась. Также значительно слабее реагировали мыши C57BL/6 на разрешающее введение антигена при двукратной схеме иммунизации с двухнедельным интервалом – только 8,7% из них погибли (по сравнению с 56,8% животных BALB/c). Также вдвое меньше погибли мышей линии C57BL/6, иммунизированных трижды – 41,2%, в то время как почти все мыши линии BALB/c при данной схеме иммунизации погибли. Таким образом, можно заключить, что системную анафилаксию можно вызвать у мышей линии C57BL/6, имеющих склонность развивать Th1-зависимый иммунный ответ, однако для достижения степени тяжести, аналогичной наблюдаемой у линии мышей BALB/c, требуется большее количество сенсibilизирующих инъекций овальбумина. Как и для мышей линии BALB/c, оптимальным режимом иммунизации для мышей линии C57BL/6 является двухнедельный интервал между повторными введениями антигена (овальбумина).

Как было сказано выше, развитие анафилаксии связано с Th2-типом поляризации иммунного ответа, для которого характерно снижение уровня цитокинов Th1-профиля (прежде всего, ИФ- γ) и увеличение выработки Т-лимфоцитами цитокинов Th2-типа (ИЛ-4), а также гиперпродукция иммуноглобулинов класса Е.

Однократная иммунизация мышей линии BALB/c вызывала значительное увеличение концентрации иммуноглобулинов класса Е в сыворотке крови (табл. 4), при этом продукция ИФ- γ и ИЛ-2 не изменялась (табл. 2). Двукратная иммунизация вызывала снижение выработки Т-лимфоцитами данных цитокинов, при этом концентрация иммуноглобулинов класса Е в сыворотке крови еще больше повышалась. При трехкратной иммунизации происходило значительное подавление продукции лимфоцитами цитокинов Th1-профиля (ИФ- γ и ИЛ-2) и повышение выработки основного Th2-цитокина – ИЛ-4 (табл. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что при введении мышам линии BALB/c овальбумина по выбранной нами схеме баланс Th1/Th2 сдвигается в сторону Th2 с развитием поляризации Th2-типа.

Известно, что парентеральное введение мышам лошадиной сыворотки приводит к анафилаксии [1]. Мы оценили признаки Th2-зависимого иммунного ответа (по продукции ИФ- γ и ИЛ-2) при иммунизации мышей линии BALB/c лошадиной сывороткой по схеме, рекомендованной вышеуказанными авторами. Как и в случае с овальбумином, однократное введение лошадиной сыворотки не вызывало изменений продукции цитокинов Th1-профиля (табл. 5). Пятикратная иммунизация с интервалом 4 дня приводила к значительному снижению уровня продукции данных цитокинов, по выраженности снижения сопоставимого с трехкратной иммунизацией овальбумином. Снижение продукции ИФ- γ и ИЛ-2 лимфоцитами селезенки при многократном введении лошадиной сыворотки следует рассматривать как свидетельство активации иммунной системы, происходящей по второму типу

поляризации (Th2), для которого характерно понижение продукции этих цитокинов [20].

Подтверждением того, что при многократных инъекциях лошадиной сыворотки развивается Th2-зависимый иммунный ответ, служат и данные анафилактического шока, наблюдавшегося после внутривенного введения лошадиной сыворотки иммунизированным животным (табл. 6). Количество погибших в результате анафилактического шока мышей колебалось от 17% до 100% в зависимости от серии эксперимента. Доля погибших животных при использовании для их иммунизации овалбумина также колебалась в разных сериях, но диапазон все же был гораздо уже, чем при иммунизации мышей лошадиной сывороткой. Поскольку все представленные серии проведены в аналогичное время года с использованием генетически контролируемых животных, то единственной причиной такого значительного разброса данных является качество самого антигена (лошадиной сыворотки), использованного для индукции системной анафилаксии. Экспериментаторы, имеющие дело с сывороткой, полученной из крови животных, и использующие ее для содержания клеточных культур, знают, что каждая партия сыворотки (причем любого производителя) может сильно отличаться от предыдущей. Поэтому каждую партию тестируют на клеточных культурах.

Следует заметить, что пятикратная иммунизация лошадиной сывороткой и двукратная овалбумином вызывают в среднем гибель половины животных от анафилактического шока. Хорошо известно, что стресс лабораторных животных, вызванный экспериментальными манипуляциями, может в значительной

мере влиять на результаты эксперимента. Поэтому задачей экспериментатора является снижение до минимума стрессорных влияний. С такой точки зрения двукратные инъекции предпочтительней пятикратных. Приведенные нами данные показывают, что иммунологические характеристики системной анафилаксии, вызванной лошадиной сывороткой или овалбумином, свидетельствуют об аналогичном типе поляризации. При этом воспроизводимость результатов в случае овалбумина несравнимо выше, чем при использовании лошадиной сыворотки.

Выводы

1. Двукратная и трехкратная иммунизация овалбумином мышей линии BALB/c с интервалом 2 недели между инъекциями позволяет получить модель системной анафилаксии с выраженным сдвигом баланса цитокинов Th1/Th2 в сторону Th2 и гиперпродукцией иммуноглобулинов класса E.

2. Использование лошадиной сыворотки для моделирования системной анафилаксии на мышах линии BALB/c вызывает развитие Th2-зависимого иммунного ответа, однако воспроизводимость результатов анафилактического шока значительно уступает модели, использующей овалбумин в качестве антигена.

3. Индукция системной анафилаксии с использованием мышей линии BALB/c и овалбумина является добротной, адекватной и экономичной биологической моделью для исследования аллергических (иммуноглобулин-E-зависимых) заболеваний.

Список литературы

1. **Емельяненко И. Н., Душкин В. А.** Характеристика общей анафилаксии // Бюлл. эксп. биол. и мед. 1971. №10. С. 69–71.
2. **Руководство** по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (под ред. Р.У. Хабриева). М.:ОАО Изд-во Медицина, 2005. С. 494–495.
3. **Хаитов Р. М., Пинегин Б. В.** Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение // Иммунология. 2003. №4. С. 196–203.
4. **Энциклопедия** лекарств № 11. М.: Изд-во ООО РЛС-2004, 2004. С. 1086–1088.
5. **Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A.** Functional diversity of helper T lymphocytes // Nature. 1996. Vol.383. P. 787–793.
6. **Calder V. L.** Cellular mechanisms of chronic cell-mediated allergic conjunctivitis // Clinical & Experimental Allergy. 2002. Vol.32, № 6. P. 814–817.
7. **Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J. et al.** Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. 1982. Vol.126. P. 131–143.
8. **Heinzel F.P., Sadick M. D., Holaday B. J. et al.** Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets // J. Exp. Med. 1989. Vol.169. P. 59–72.
9. **Hsieh C. S., Macatonia S. E., O'Garra A., Murphy K. M.** T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro // J. Exp. Med. 1995. Vol.181. P. 713–721.
10. <http://www.unrussia.ru/institutions/who.html>.
11. **Khoury S. J., Hancock W. W., Weiner H. L.** Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with down regulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain // J. Exp. Med. 1992. Vol.176, №5. P. 1355–1364.
12. **Krug N., Frew A. J.** The Th 2 cell in asthma: initial expectation yet to be realized // Clin. Exp. Allergy. 1997. Vol.27. P. 142–148.
13. **Le Gros G., Ben Sasson S. Z., Seder R. et al.** Generation of IL-4-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for the in vitro generation of IL-4 producing cells // J. Exp. Med. 1990. Vol.172. P. 921–924.
14. **Locksley R. M., Heinzel F. P., Holaday B. J. et al.** Induction of Th1 and Th2CD4+ subsets during murine Leishmania major infection // Res. Immunol. 1991. Vol.142. P. 28–32.
15. **Mackay I. R., Rosen F. S.** Allergy and allergic diseases // N. Engl. J. Med. 2001. Vol.344, №1. P. 30–37.
16. **Maeda H., Shiraiishi A.** TGF-beta contributes to the shift toward Th 2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice // J. Immunology. 1996. Vol.156, №1. P. 73–78.
17. **Mason D., Powrie F.** Control of immune pathology by regulatory T cells // Curr. Opin. Immunol. 1998. Vol.10. P. 649–655.
18. **Moore S. C., Th eus S. A., Barnett J. B., Soderberg L. S. F.** Cytokine regulation of bone marrow natural suppressor cell activity in the suppression of lymphocyte function // Cell. Immunol. 1992. Vol.141. P. 398–408.
19. **Mosmann T. R.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. 1983. Vol.65. P. 55–63.
20. **Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W. et al.** Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins // J. Immunol. 1986. Vol.136, №7. P. 2348–2357.
21. **Nomura I., Goleva E., Howell M. D et al.** Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes // J. Immunol. 2003. Vol.171. P. 3262–3269.
22. **O'Garra A.** Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets // Immunity 1998. Vol.8. P. 275–283.
23. **Oshiba A., Hamelmann E., Haczku A. et al.** Modulation of antigen-induced B and T cell

responses by antigen-specific IgE antibodies // J. Immunol. 1997. Vol.159. P. 4056–4063.

24. *Pakala S. V., Kurrer M.O., Katz J. D.* T helper 2 (Th 2) cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice // J. Exp. Med. 1997. Vol.186. P. 299–306.

25. *Postlethwaite A. E., Holness M. A., Kattai H., Raghov R.* Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin-4 // J. Clin. Invest. 1992. Vol.90. P. 1479–1482.

26. *Romagnani S.* Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more // Immunol. Today. 1991. Vol.12. P. 256–260.

27. *Seder R. A., Gazzinelli R., Sher A., Paul W. E.* IL-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for IFN- γ production and

diminishes IL-4 inhibition of such priming // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1993. Vol.90. P. 10188–10192.

28. *Sornasse T., Larenas P. V., Davis K. A. et al.* Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level // J. Exp. Med. 1996. Vol.184. P. 473–478.

29. *Steliarova-Foucher E., Stiller C., Kaatsch P. et al.* Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCIS project): an epidemiological study // Lancet 2004. Vol.364. P. 2097–2105.

30. *Williamson E., Garside P., Bradley J. A.* IL-12 is a central mediator of acute graft-versus-host disease in mice // J. Immunol. 1996. Vol.157, № 2. P. 689–699.

Modelling of an anaphylaxis using BALb/c mice

N. V. Belska, M. G. Danilets, Y. P. Belsky, E. S. Trofimoва, E. G. Utchasova, O. S. Borsuk, V. I. Agafonov

The aim of the research was to substantiate a possibility and to demonstrate an advantage of an anaphylaxis model using mice BALb/c and ovalbumin as antigen. Study had been carried out with mice BALb/c for comparison mice C57BL/6. Various procedures and plans of immunization by ovalbumin had been used; also, extent of anaphylactic shock weight had been evaluated in dependence of mice strains and immunization procedure. Th1/Th2 cytokine production by spleen-derived T cells and immunoglobulin E content in serum blood had been measured. It had been shown, that repeatability data of anaphylactic shock induced by a horse serum were lower than ones induced by ovalbumin. Authors concluded, that model of anaphylaxis in mice BALb/c induced by ovalbumin is a good, adequate and economical biological model for an investigation of allergic immunoglobulin E-dependent diseases.

Key words: anaphylaxis; Th1 and Th2 cytokines; immunoglobulin E.



Цитотоксическое действие биорага и аммиачной селитры на лабораторных мышей

Р. А. Гахокидзе, А. Г. Пирцхелани, Н. А. Пирцхелани,
Н. Богверадзе, Г. Д. Капанадзе

*Тбилисский Государственный Университет, Тбилиси, Грузия
Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

*Контактная информация: Республика Грузия 38079 г. Тбилиси, Н. Абашидзе, 31,
Тбилисский медицинский университет, тел.: (10-495-32) 42-42-11*

На лабораторных мышах изучено мутагенное и цитотоксическое действие биоактивных веществ – биорага и аммиачной селитры. Пероральное введение животным аммиачной селитры (доза $1/2$, $1/5$, ЛД₅₀) вызывает достоверное повышение ($p < 0,001$) количества структурных аберраций хромосом, геномных мутаций патологических митозов и нарушение интерфазных ядер. Биораг характеризуется выраженным антимуагенным и антицитотоксическим действием. Цитогенетический анализ клеток мышей, получающих кукурузу, выращенную на почве обработанной биорагом и аммиачной селитрой, показали, что цитогенетические нарушения не отличаются от контроля.

Ключевые слова: биораг, аммиачная селитра, митоз, хромосомы, мыши.

Деятельность человечества вызвала изменение природных ландшафтов: загрязнение рек, морей, океанов, атмосферы и почвы [2]. Быстрое развитие химической промышленности способствовало образованию огромного количества химических соединений, которые ранее в природе не встречались. Большинство этих веществ вызывают повреждение генетического аппарата живых организмов и в особенности человека, с чем впоследствии связано образование не только наследственных болезней, врожденных аномалий и злокачественных образований, но и болезней сердечно-сосудистой, нервной, пищеварительной систем и др. [1].

Исходя из вышесказанного, представляется необходимым проведение ряда мероприятий, направленных против негативного воздействия повреждающих агентов с целью защиты генетического аппарата и здоровья человека. Среди них можно выделить следующие.

1. Выявление и изъятие из использования вредных веществ или их замену неопасными аналогами.
2. Определение безопасных доз химических препаратов.
3. Выявление и использование эффективных антимуагенов, которые максимально уменьшат повреждение генетического аппарата [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение хромосомных аномалий и патологических митозов при воздействии аммиачной селитры отдельно и на фоне биоактивных веществ – биорага.

Материалы и методы

Работа выполнена на взрослых нелинейных белых мышах. Из химических соединений было использовано азотное удобрение – аммиачная селитра. В качестве антимутагена было использовано биоактивное соединение – биораг. Исследования были проведены на 40 белых мышах весом 20–25 г в 5 сериях.

I серия – цитогенетическое изучение действия аммиачной селитры при однократном пероральном введении животным в дозе 175 мг/кг ($1/2$ ЛД₅₀) и 70 мг/кг ($1/5$ ЛД₅₀).

II серия – цитогенетическое исследование клеток костного мозга мышей при предварительном введении биорага (в течение пяти дней) с последующим однократным (на 6-й день) введением аммиачной селитры в дозе 175 мг/кг.

III серия – цитогенетическое исследование клеток костного мозга мышей при предварительном введении биорага (в течение пяти дней) с последующим однократным (на 6-й день) введением аммиачной селитры в дозе 70 мг/кг.

IV серия – цитогенетическое исследование животных, вскормленных кукурузой, выращенной на почве, обработанной биорагом и аммиачной селитрой.

V серия – контроль.

Хромосомные препараты из костного мозга животных готовились по методу Форда и Воллама [8]. Изучение нарушенных интерфазных ядер проводилось по модифицированному методу А. Пирцхелани [5]. Токсичность вещества определялась по методу И. Саноцкого [6].

Все цифровые данные обработаны методом вариационной статистики Фишера, t-критерий определяли по таблице Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что аммиачная селитра характеризуется

Таблица 1

Результаты цитогенетического исследования клеток мышей при отдельном и комбинированном воздействии аммиачной селитры и биорага

Показатель	Аммиачная селитра		Аммиачная селитра + биораг	
	5		4	
Количество животных	5		4	
Доза, мг/кг	175 ($1/2$ ЛД ₅₀)	70 ($1/5$ ЛД ₅₀)	175+30	70+30
Количество исследованных метафаз	419	400	450	450
Структурные нарушения хромосом и геномные мутации, %±ст. ош	8,8±1,5	5,73±1,07	3,0±0,3	1,0±0,2
Патологические митозы, %±ст. ош	21,4±2,0	15,3±1,7	8,6±1,8	6,0±1,1
Число нарушений интерфазных ядер, %±ст. ош	4,5±0,18	2,6±0,29	1,5±0,2	1,1±0,3
P	<0,001		–	

выраженным мутагенным действием. В частности, число аномальных метафаз и патологических митозов при примененной дозе препарата $1/2$ от LD_{50} увеличивается до 30,2% (в контроле 3,5%). Наиболее часто наблюдаются патологические митозы, из которых характерными являются полые метафазы, К-метафазы и слипание хромосом. Из структурных нарушений хромосом наблюдаются одиночные и парные фрагменты и лизис хромосом, а из геномных мутаций характерными являются триплоидные клетки (табл. 1).

Анализ полученного нами материала также показал, что аммиачная селитра вызывает нарастание нарушения интерфазных ядер, при которых плотноконденсированный хроматин располагается в виде кольца по периферии клетки, а середина остается пустой [5].

При воздействии на животных более малыми концентрациями аммиачной селитры ($1/5$ LD_{50}) был выражен «доза-эффект». При использовании аммиачной селитры $1/5$ от LD_{50} , цитогенетический эффект по сравнению с более высокой концентрацией ($1/2$ от LD_{50}) частично уменьшается и составляет 5,73% для структурных нарушений хромосом и геномных мутаций и 15,3% – для патологических митозов.

Известно, что генетический аппарат клетки, который подвергается тяжелым нарушениям (фрагментация, лизис хромосом, К-метафаза, полая метафаза, полая интерфаза), в дальнейшем элиминируется [4], то есть имеет место цитотоксическое действие, что является показателем как мутагенного, так и общетоксического действия.

Как показали результаты исследования, введение биорага до внесения минеральных удобрений в 3 раза снижает цитогенетический эффект, вызванный аммиачной селитрой, так как число аномальных метафаз и патологических митозов при изолированном воздействии аммиачной селитры повышается до 30,12%, а в случае предварительного введения в организме биорага эти показатели снижались до 11,6% ($p < 0,001$). Данные, полученные нами, совпадают с данными других авторов, которые изучили антимутагенное действие разных витаминов и других биоактивных веществ [7, 9, 10, 11].

В последней серии исследования провели цитогенетический анализ клеток мышей, которых кормили кукурузой, выращенной на почве, обработанной биорагом и аммиачной селитрой. Установлено, что в этом случае цитогенетические нарушения не отличаются от контроля (табл. 2).

Таблица 2

Цитогенетический анализ клеток мышей, вскормленных кукурузой (20 день), выращенной на почве, обработанной биорагом и аммиачной селитрой

Показатель	Аммиачная селитра + биораг	Контроль
Количество животных	7	5
Количество исследованных метафаз	475	500
Структурные нарушения хромосом и геномные мутации, %±ст. ош	0,84	0,8±0,39
Патологические митозы, %±ст. ош	1,05	2,7±0,6
Число нарушений интерфазных ядер, %± ст. ош	0,58±0,1	0,5±0,1

Выводы

1. Аммиачная селитра характеризуется мутагенным и цитотоксическим действием. Пероральное введение животным аммиачной селитры (доза $1/2$, $1/5$ ЛД₅₀) вызывает достоверное повышение ($p < 0,001$) количества структурных нарушений хромосом (одиночные и парные фрагменты, лизис хромосом) и геномных мутаций (анеуплоидия, триплоидия), патологических митозов (полая метафаза, К-метафаза, слипание хромосом) и нарушение интерфазных ядер (полное ядро).

Список литературы

1. Александров У. К. Антимутагенез. М.: Наука, 1984.

2. Дубинин Н. П., Пашин Ю. В. Мутагенез и окружающая среда. М.: Наука, 1978.

3. Лесявичюс Р. К. Химический мутагенез и загрязнение окружающей среды. Новосибирск, 1977.

4. Михайлова Г. Р., Горбунова Л. П. Цитологическое и кариологическое изучение культур клеток человека // Цитол. и генетика 1980. Т.10, №6. С. 582–584.

5. Пирцхелани А. Г., Мамаладзе Н. В. Нарушение инетрфазных ядер и хромосом как показатель общетоксического и мутагенного действия факторов среды на орагнизма. Методические рекомендации. Тбилиси, 1991.

6. Саноцкий И. В., Фоменко В. Н. Значение прикладной генетики для токсикологической оценки новых веществ. / В. Кн. Токсикология. 2003. С. 17–23.

2. Биораг обладает выраженным антимутагенным и антицитотоксическим действием и в среднем в три раза уменьшает количество цитогенетических нарушений, вызываемых аммиачной селитрой.

3. Анализ клеток мышей, вскормленных кукурузой, выращенной на почве, обработанной биорагом и аммиачной селитрой, показал, что в этом случае цитогенетические нарушения не отличаются от контроля.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного научного гранта № GNSF/STO 6/8-065 (Грузия).

7. Durnev A .D., Sidneva E. S., Zhanataev A. K. et al. The protective action of vitamins in induced mutagenesis // Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 2007. Vol.7. P. 6–13.

8. Ford E., Wollam D. A. Study of the mitotic chromosomes of mise of the strong line // Esp. Call Res. 1963. Vol.32. P. 320–326.

9. Kada T. Mechanismes and Genetic Implications of Environmental Antimutagens // Environmental Mutagens and carcinogens. 1992. P. 355–359.

10. Nikitina V. A., Vrzhesinskaya O. A., Beketova N. A. et al. Effect of regular intake of vitamin-mineral complex on spontaneous and on induced clustogenesis in humans // Bull. Exp. Biol. Med. 2000. Vol.130, №9. P. 867–870,

11. Sidneva E. S., Katosova L. D., Platonova V.I. et al. Effects of vitamins supply on spontaneous and chemically induced mutagenesis in human cells // Bull. Exp. Biol. Med. 2005. Vol.139, №2. P. 230–234.

Investigation of cytotoxic action of ammonium nitrate and biorag on laboratory mice

R. Gakhokidze, A. Pirtskhelani, N. Pirtskhelani, N. Bogveradze, G. Kapanadze

The present study investigates antimutagenic and anticytotoxic effects of biorag in laboratory mice. Mutation in mice was induced by ammonium nitrate, which is characterized by the mutagenic and cytotoxic effect. The ten-day administration of ammonium nitrate ($1/2$, $1/5$ LD₅₀ dose) per or to animals induces strong increase ($p < 0,001$) of frequency of chromosomal aberrations (deletions, multiple fragments, lyses) genomic mutations (triploidy, tetraploidy), pathological mitosis (hollow metaphase, K-mitosis, chromosomal adhesion)

and destruction of interphase nucleuses (hollow nucleus). Experiments showed that biorag exerted highly effective antimutagenic and anticytotoxic actions. Biorag decreased the incidence of the mutagenic and cytotoxic effects of the ammonium nitrate about 3 times. Analysis of the cells of mice, eating corn grown on ground fertilized with ammonium nitrate and biorag showed that in this case cytogenetic disorders are the same as in control group.

Key words: biorag, ammonium nitrate, mitosis, chromosome, mice.



Новые клинико-фармакологические подходы к лечению эпидермальных проявлений папилломавирусной инфекции

Н. Г. Бердникова, Д. А. Фартух, В. Н. Иванова, В. Г. Сорокин

*Научный центр экспертизы средств медицинского применения
Росздравнадзора, Москва
медсанчасть 165, Москва
медицинский центр Эсперансо-М, Москва
поликлиника 209, Москва*

*Контактная информация: Бердникова Надежда Георгиевна, 8-926-522-68-78,
e-mail: berdnad@mail.ru. 109240, Москва, ул. Яузская 11, корп 4. 23 ГКБ им. «Медсантруд»*

Исследование эффективности и безопасности биологической активной добавки, содержащей индол-3-карбинол, в составе стандартной терапии в лечении и преодолении рецидивирования эпидермальных проявлений папилломавирусной инфекции показало, что БАД с И-3-К достоверно уменьшает прогрессирование и появление новых элементов аногенитального кондиломатоза, а также способствует более быстрой элиминации вируса папилломы человека (ВПЧ).

Ключевые слова: индол-3-карбинол, эпидермальная папилломавирусная инфекция, вирус папилломы человека, интерферон.

Последние годы папилломавирусная инфекция (ПВИ) находится под пристальным вниманием врачей многих специальностей. Это обусловлено не только порой непредсказуемым течением ПВИ, но и проблемами, связанными с проведением эффективного и надежного лечения этой патологии. Другой важный вопрос для врачей и пациентов – это угроза развития онкозаболеваний, связанных с вирусом папилломы человека (ВПЧ). Выбор тактики ведения: наблюдение или активная терапия, оценка эффективности проводимого лечения, возможность рецидивов, угроза онкогенности по-прежнему остаются важны-

ми вопросами для врачей, сталкивающихся с лечением ПВИ [4, 5, 6, 8].

В большинстве случаев эпидермальные проявления ПВИ не вызывают онкогенной настороженности, но могут доставлять пациентам массу неудобств. Особенно остро стоит проблема преодоления рецидивирования папилломатоза. Клинические проявления эпидермальной ПВИ чрезвычайно многообразны. На сегодняшний день наибольшей популярностью пользуется классификация на основании внешнего вида и локализации бородавок. Эта таксономия выделя-

ет четыре различных группы. Наиболее распространены 4 из них.

1. Вульгарные бородавки («*verruca vulgaris*»), которые составляют 70% от всего количества ПВИ, преимущественные места локализации – руки, хотя они могут появляться на любых частях тела, включая слизистые оболочки.

2. Плантарные бородавки («*verruca plantaris*») также широко распространены. Подошвенные бородавки локализуются на пятках и плюсневой области, т.е. местах, подвергающихся наибольшему давлению. По мере роста они подвергаются постоянному воздействию давления при ходьбе, что приводит к росту бородавок внутрь (эндофитному росту) в отличие от экзофитного роста генитальных бородавок.

3. Плоские бородавки («*verruca plana*») наиболее часто обнаруживаются на лице, шее и конечностях, они не выступают над поверхностью кожи и варьируют по размерам, обычно от 2 до 5 мм в диаметре, различаются по цвету: от телесного до красного и коричневого.

4. Генитальные бородавки («*condyloma acuminata*»), на долю которых приходится наименьший процент от общего количества ПВИ. Остроконечные кондиломы чаще всего появляются в аногенитальной области, но могут быть локализованы и в других местах. Размер колеблется от совсем маленьких до достаточно объемных. Наиболее редко встречающиеся бовеноидный папулез и болезнь Боуэна проявляются видимыми поражениями кожи, связанными с онкогенными типами ВПЧ. Гигантская кондилома Бушке–Левенштайна – очень редкий вариант ПВИ, который характеризуется агрессивным ростом вглубь в

подлежащие структуры дермы, редко озлокачивается. ВПЧ является эпителиотропным и обнаруживается в кожном покрове, слизистой оболочке рта, трахее, конъюнктиве, пищеводе, бронхах, прямой кишке, влагалище, шейке матки. Инкубационный период ПВИ составляет от 3–4 месяцев до 3 лет [18]. При отсутствии терапии существуют три варианта развития событий: очаги ВПЧ-инфекции могут разрешаться самостоятельно, оставаться без изменений или прогрессировать. При этом всегда нужно принимать во внимание возможность персистенции вируса при отсутствии каких-либо клинических проявлений (рис. 1).

В литературе имеются сведения о том, что внедрение ВПЧ-инфекции происходит на уровне незрелых клеток эпителия кожи и слизистых оболочек (базальный слой). В результате запускается выраженная клеточная пролиферация, но без продукции вирусных частиц. На месте внедрения вируса образуется разрастание клеток эпителия в виде разнообразных по форме и величине бородавок, папиллом, кондилом. Сам вирус в глубоких слоях не размножается, его интенсивное размножение происходит в поверхностных слоях — в чешуйчатых клетках, которые по мере оттеснения к поверхности перестают делиться и становятся более пригодными для размножения вируса. Для различных

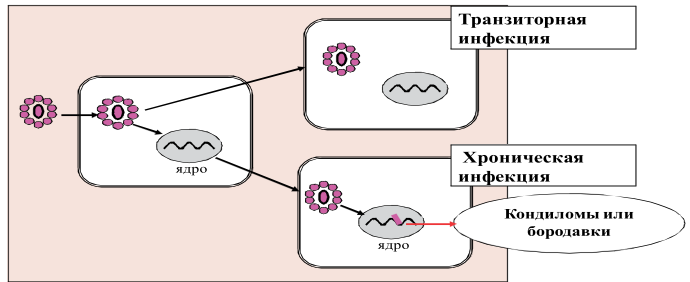


Рис. 1. Варианты течения ВПЧ-инфекции

**Типы вирусов ВПЧ, вызывающие различные клинические проявления ПВИ
(по данным [18])**

Заболевания и клинические проявления	Типы ВПЧ
Поражения кожи: Бородавки на подошве стопы (мозоли) Обычные бородавки Плоские бородавки Бородавки Butcher Веруциформная эпидермодисплазия	1, 2, 4 2, 4, 26, 27, 29, 57 3, 10, 28, 49 7 2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20-25, 36, 37, 46, 47, 50
Поражения слизистых половых органов: Остроконечные кондиломы Сквамозные интраэпителиальные поражения (подобные поражения высокого риска могут быть предраковым состоянием) Карцинома (рак шейки матки, гораздо реже встречающиеся раки вульвы, влагалища, области анального отверстия и полового члена)	6, 11, 42- 44, 54 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 39, 40, 42, 43, 51, 52, 55, 57-59, 61, 62, 64, 67-70 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 66, 68
Поражения других (не генитальных) слизистых оболочек: Слизистая рта (фокальная эпителиальная гиперплазия) Рецидивный папилломатоз дыхательных путей Карцинома (рак головы, шеи, легких)	13, 32 6, 11, 30 2, 6, 11, 16, 18, 30

типов ВПЧ характерна определенная тканевая и видоспецифичность (рис. 2) [1].

ВПЧ обоснованно считается причиной кожных и генитальных бородавок, и лишь относительно недавно были обнаружены онкогенные свойства папиллома-вирусов. Широкое внедрение молекулярно-биологических методов (например, полимеразной цепной реакции) сделало возможным скрининг, выявление групп риска, в частности рака шейки матки, и позволило осуществлять контроль эффективности лечения. Типы ВПЧ с высоким онкогенным потенциалом могут вызывать плоскоклеточный рак промежности, вульвы, шейки матки, полового члена, заднепроходного канала, кожи. Особенно опасны эти типы папиллом для женщин – по данным исследова-

ний, ВПЧ высокоонкогенного риска значительно повышает опасность развития рака шейки матки. Однако наличие ВПЧ «необходимо», но не «достаточно» для развития этого онкозаболевания [6]. Считается, что факторами, способными привести к любым клиническим проявлениям ПВИ, являются: снижение иммунитета, длительное использование гор-



Рис.2. Проявления ПВИ в зависимости от типа ВПЧ

мональных противозачаточных средств, наличие других урогенитальных инфекций, таких как хламидии, а именно *Chlamydia trachomatis*, вирус простого герпеса 2-го типа, авитаминоз, в частности дефицит витамина А, генетическая предрасположенность, контакт с партнером, имевшим контакты с женщиной, болеющей раком шейки матки или аногенитальными кондиломами, курение, алкоголь, беременность, эндометриоз, стресс, большие хирургические вмешательства. Такие факторы, как высокая сексуальная активность (раннее начало половой жизни, большое количество партнеров, частые половые контакты) приводят скорее к повышению вероятности инфицирования, чем относятся к истинным факторам риска. Риск появления злокачественных новообразований вызывают остроконечные кондиломы на шейке матки у женщин или на головке полового члена у мужчин. Кондиломы, локализованные в остальных местах (в том числе и в области половых органов), редко представляют онкогенную опасность и вызывают по большей части косметические неудобства, чувство тревоги, снижают самооценку.

Для выявления ВПЧ и определения его типа обычно используют метод ПЦР – классическую ДНК-диагностику вируса папилломы. Это необходимо для того, чтобы определить риск онкогенности ВПЧ в каждом конкретном случае. Положительный результат анализа при отсутствии проявлений заболевания не означает необходимость проведения лечения или профилактики развития вируса, в данном случае возможна и наблюдательная тактика [9, 19].

Современные методы терапии ПВИ делаются в основном на две группы: деструктивная терапия, направленная на удаление измененной ткани, и терапия иммуноло-

гическими препаратами. Цель деструктивного лечения – удаление пролиферативной ткани, однако на элиминацию ВПЧ эти методы не влияют. К иммунологическим методам лечения ПВИ, относится терапия такими препаратами, как интерферон-виферон, кипферон, реаферон, роферон-А, интрон А, реальдирон, а также иммуномодуляторами, среди которых наибольшей популярностью в нашей стране пользуются полудан, амиксин, иммунал, циклоферон, иммуномакс, полиоксидоний [2, 8, 9, 10]. Представляет интерес местное использование имиквимода, который является индуктором цитокинов. Наконец, имеются препараты для местного применения – кремы, гели, спреи, которые повышают иммунитет и снижают концентрацию вируса в тканях местно. В связи с этим традиционно вместе с деструкцией используют противовирусные препараты: интерфероны и иммуномодуляторы. Однако ни один из указанных способов лечения не может быть признан панацеей, так как частота рецидивов, являющаяся главным показателем любого способа лечения, остается достаточно высокой. Эффективность применяемых методов варьирует от 50% до 94%, а частота рецидивирования составляет в среднем 25–30% в течение трех месяцев после лечения [6, 9]. Известно, что рецидивы ПВИ чаще всего связаны с реактивацией инфекции, а не с реинфекцией.

Таким образом, на сегодняшний день по-прежнему остается открытым вопрос о повышении эффективности лечения ПВИ, особенно в случаях высокоонкогенных типов ВПЧ, и преодоление рецидивирования. Во многих странах сегодня для профилактики и лечения ПВИ используется пищевой индол-3-карбинол. В нашей стране имеются различные фармакологические средства, содержа-

щие индол-3-карбинол, который обладает целым спектром уникальных способностей.

1. Индуцирует активность изофермента 1A1 цитохрома P450, смещая метаболизм эстрадиола в пользу 2-гидроксиэстрогена (2-OHE1), препятствуя образованию канцерогенного 16 α -гидроксиэстрогена (16 α -OHE1), способного поддерживать пролиферацию [4, 5, 11, 12, 14].

2. Блокирует онкобелки E6 и E7, препятствуя дальнейшей пролиферации инфицированных ВПЧ клеток, а также делая их доступными для действия эндогенного и экзогенного интерферона [4, 5, 12].

3. Индуцирует апоптоз вирус-инфицированных клеток [2, 3, 4, 8].

В зарубежной и отечественной литературе имеются многочисленные и несколько противоречивые сообщения об эффективности лечения ПВИ при присоединении индол-3-карбинола [3, 7, 13, 15, 16, 17, 20].

Целью нашего исследования было изучение эффективности, безопасности и противорецидивной активности отечественного БАД с индол-3-карбинолом при лечении ПВИ в дерматовенерологической и урологической практике.

Дизайн исследования

К исследованию были привлечены врачи-дерматологи и урологи.

В исследование включались пациенты, имеющие остроконечные кондиломы, вульгарные, плоские и/или подошвенные бородавки (впервые выявленные и/или рецидивирующие) любой локализации, независимо от результатов ПЦР-теста на ВПЧ.

Цель исследования: сравнить эффективность и безопасность БАД с индол-3-карбинолом (не менее 300 мг в сутки) в

комбинации с препаратами интерферона и/или иммуностимуляторами и стандартной терапии препаратами интерферона и/или иммуностимуляторами. Выбор препаратов интерферона и/или иммуностимуляторов проводился на усмотрение врачей-исследователей. При необходимости проводилась антибактериальная (АБ) и/или противовирусная терапия (ацикловир).

Исследование было открытым пилотным рандомизированным и проводилось независимыми исследователями, не имеющими возможности делиться опытом использования БАД с индол-3-карбинолом друг с другом, что, несомненно, повысило качество исследования.

Несмотря на общие цель и критерии включения, исследование было подразделено на 2 блока.

В блок I были включены 20 пациентов (19 мужчин и 1 женщина) с диагнозом остроконечные кондиломы аногенитальной области, возраст пациентов составил $41,4 \pm 5,12$ лет. У всех пациентов исключались эпидермальные проявления ПВИ любой другой локализации.

В блок II были включены 36 пациентов (15 мужчин и 21 женщина) с диагнозом вульгарные, плоские и/или подошвенные бородавки, возраст $26,6 \pm 3,5$ лет, ПВИ аногенитальной области исключались.

Обработка результатов проводилась с помощью непараметрических методов статистики (Mann-Whitney test).

Исследование продолжалось 6 месяцев и включало 3 визита: визит 1 – исход, на котором в зависимости от тактики лечения проводилось распределение пациентов на группы; визит 2 – через 3 месяца; визит 3 – через 6 месяцев. На усмотрение врача-исследователя проводились промежуточные визиты для дополнительной

оценки и возможной коррекции проводимого лечения. Для пациентов II блока проводился телефонный контакт каждые 2 недели в течение 2-х месяцев от начала лечения. Обязательным в исследовании были: сбор анамнеза; на каждом визите – осмотр, ПЦР-исследование (соскоб/мазок из уретры или шейки матки в случае кондилом аногенитальной области), уретроскопия, кольпоскопия, выявление сопутствующей бактериальной флоры, деструктивные или хирургические методы лечения, проводившиеся на разных визитах на усмотрение врача-исследователя. При выявлении сопутствующей бактериальной инфекции, передающейся половым путем (ИППП), или вируса простого герпеса пациентам назначались антибактериальные препараты или ацикловир.

Характеристики исследования блока I у пациентов с проявлениями ПВИ аногенитальной области

Материалы и методы исследования

У пациентов этого блока распределение на группы в зависимости от используемых схем лечения происходило следующим образом:

1 группа – группа «БАД с индол-3-карбинолом» – 12 пациентов (мужчины) с кондиломами аногенитальной области, шесть из них имели сопутствующие ИППП, двое были носителями ПВИ.

2 группа – группа «Стандартная терапия» – 8 пациентов (7 мужчин, 1 женщина) с кондиломами аногенитальной области, у троих обнаружены сопутствующие ИППП. В группе «Стандартная терапия» врачи отдавали предпочтение следующим препаратам: валтрекс, циклоферон, гепон, аллокин-альфа, иммуномакс, изоприназин. Пути введения – пероральный, внутримышечный, вну-

тривенный, вагинальный, инстилляции или орошения. Препараты были назначены в рекомендуемых для лечения ПВИ дозах и схемах.

Всем пациентам на визите 1 проводилась деструкция кондилом, с дальнейшим повтором в случаях необходимости. Методы для удаления кондилом были следующие: хирургическая эксцизия, химическая деструкция трихлоруксусной кислотой, цитотоксическая деструкция (солкодерм). Выбор метода зависел от размера, количества, характера роста и типа кондиломатозных высыпаний. Была проведена уретроскопия и кольпоскопия для исключения поражений слизистой.

Результаты исследования

При анализе анамнеза выяснилось, что продолжительность заболевания составляет $1,53 \pm 0,4$ года; все пациенты отмечали рост и/или подсыпание новых элементов в период от 4-х месяцев до 2-х недель перед включением в исследование. 25% пациентов ранее обращались по поводу кондилом (1 пациент получал иммуностимуляторы, 1 – фитопрепараты, 3 пациентам была проведена деструкция). На визите 1 у 19 пациентов были выявлены остроконечные кондиломы аногенитальной области, у одного пациента отмечались высыпания еще и в подмышечных впадинах. Количество и локализация были весьма разнообразными: от единичных мелких высыпаний до множественных крупных кондилом. У всех пациентов на визите 1 выявлены при проведении ПЦР-анализа (соскоб/мазок из уретры или шейки матки) следующие типы ВПЧ – 6, 11, 16, 18, 31 и 33. При этом у 70% пациентов были выявлены ВПЧ 16, 18, 31 типов, один паци-

ент являлся носителем ВПЧ 6 типа. Ранее никому из пациентов ПЦР-анализ на ВПЧ не проводился.

Через две недели для контроля эффективности был проведен промежуточный визит, на котором у 37,5% больных из 2-й группы обнаружилось подсыпание новых элементов, что потребовало деструктивного вмешательства. Через 3 месяца у других 25% пациентов из второй группы отмечалось подсыпание новых элементов, потребовавшее повторных деструктивных методов лечения. Таким образом, у 62,5% из группы «Стандартная терапия» отмечалось в разные сроки (на протяжении 4-х месяцев) подсыпание новых элементов несмотря на активно проводимую терапию, что потребовало повторного проведения деструкции другим способом. Рецидивов у этих пациентов не было.

В 1 группе 83,3% пациентов получали БАД с индол-3-карбинолом в качестве единственного средства и 16,6% – в комбинации с препаратами интерферона или иммуномодулятором. В этой группе к повторным деструктивным методам пришлось прибегнуть через 3 месяца только одному пациенту, что было связано не с появлением новых элементов, а с невозможностью удаления поражений за один прием. Ни рецидивов, ни подсыпания новых элементов у пациентов 1 группы зарегистрировано не было.

При оценке динамики ПЦР-исследования на ВПЧ ситуация выглядела по-разному. Так, в 1 группе через 3 месяца лечения ВПЧ определялся лишь у 33% пациентов, в отличие от пациентов 2 группы, продемонстрировавших 100% положительный ПЦР-анализ на ВПЧ. Через 3 месяца ни у одного из пациентов 1 группы ВПЧ в соскобах/мазках не обнаруживался, а 50% пациентов второй группы продемонстрировали сохраняющуюся ВПЧ-инфекцию (табл. 2). Следует отметить, что через 3 месяца в первой группе было выявлено ВПЧ только 16 типа, других типов ВПЧ обнаружено не было.

66,7% пациентов 1 группы закончили прием БАД уже через 3 месяца, и только 33,3% пациентов (2 пациента принимали индол-3-карбинол, 2 – иммуномодуляторы) понадобилось продолжить лечение до 6 месяцев, что было связано не с рецидивами или подсыпаниями новых папилломатозных элементов, а с сохраняющимися положительными ПЦР-анализами. Лечение пациентов 2 группы растянулось до 6 месяцев, при этом врачи-исследователи вынуждены были менять схемы и количество используемых препаратов на каждом визите. Однако несмотря на это, у 50% пациентов не удалось добиться элиминации ВПЧ, подтвержденной ПЦР-исследованием (табл. 2). В дальнейшем эти пациенты были отслежены уже вне

Таблица 2

Частота выявления ВПЧ-инфекции методом ПЦР в зависимости от проводимого лечения через 3 (визит 2) и 6 (визит 3) месяцев от начала терапии

Визиты, кол-во месяцев от начала терапии	% пациентов с «+» результатами ПЦР на ВПЧ		p
	1 группа	2 группа	
3 месяца	33%	100%	<0,05
6 месяцев	0%	50%	<0,05

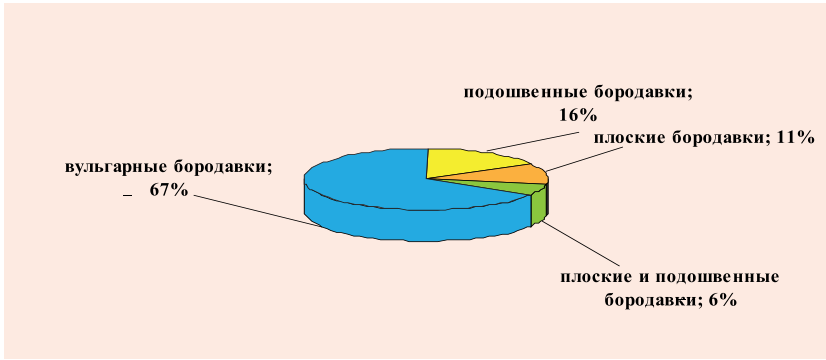


Рис. 3. Распределение пациентов в зависимости от вида эпидермальных папилломатозных очагов

рамок проводимого исследования и выяснилось, что отрицательный результат ПЦР-анализа на определение ВПЧ-инфекции был достигнут в период от 2 до 4-х месяцев после окончания исследования без лечения у двух больных, однако еще у двух ПЦР-анализ оставался положительным.

Таким образом, можно считать, что индол-3-карбинол предотвращает рецидивы, прогрессирование и появление новых элементов кондиломатоза, а также способствует более быстрой и эффективной элиминации ВПЧ, подтвержденной ПЦР-исследованием.

При оценке переносимости лечения были отмечены гриппоподобные явления при использовании препаратов интерферона у 2 пациентов. У пациентов, получающих БАД с индол-3-карбинолом, нежелательных явлений выявлено не было. При опросе пациентов об удобстве приема препаратов выяснилось, что практически все тяготились необходимостью использовать лекарства парентерально, особенно в случаях назначения повторных курсов препаратов, а также необходимостью проведения повторных деструкций, что явно снижало качество жизни пациентов и их социальную активность. Все пациенты отдавали пред-

почтение пероральному приему препарата.

Характеристики исследования блока II у пациентов с вульгарными, плоскими и/или подошвенными бородавками

Материалы и методы

Все пациенты блока II были разделены на 3 группы, каждая группа состояла из 12 пациентов. Проведены следующие виды лечения.

1 группа – БАД с индол-3-карбинолом, не менее 300 мг в сутки.

2 группа – БАД с индол-3-карбинолом, не менее 300 мг в сутки + циклоферон (линимент местно 35,2±1,2 дня) + реаферон п/к в крупные очаги, общая доза 1 млн (курс 12–14 дней).

3 группа – циклоферон (линимент местно 36,5 ± 0,9 дня) + реаферон 1 млн п/к в крупные очаги (курс 12–14 дней).

Результаты исследования

При осмотре на визите 1 у 84% пациентов были выявлены вульгарные и/или плоские бородавки с преимущественным поражением кистей и пальцев рук, из всех пациентов поражение стоп наблюдалось у шести человек, из них двое имели только плоские подошвенные бородавки без заинтересованности кистей

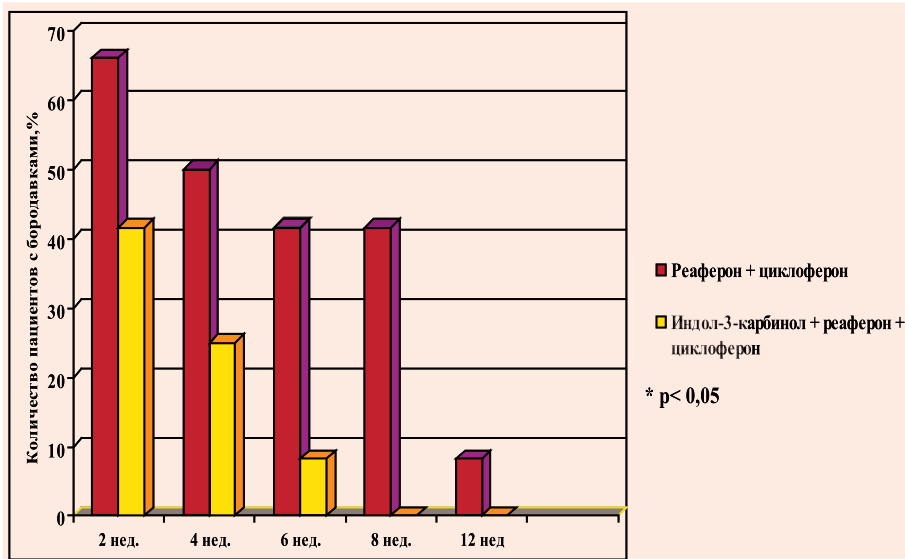


Рис. 4. Влияние различных вариантов терапии на разрешение эпидермальных папилломатозных очагов

(рис. 3). Большинство пациентов беспокоили эстетические проблемы, у восьми пациентов (22,2%) (шесть пациентов с бородавками стоп и два пациента с межпальцевыми поражениями) наличие бородавок сопровождалось субъективной симптоматикой, преимущественно болью. Ранее проводилась криодеструкция бородавок с помощью лазера 16,6% пациентам, и повторное обращение связано с рецидивами. В 22,2% наблюдениях имелись анамнестические указания на подсыпание новых элементов за последние 1,5–3 месяца перед включением в исследование; 66,6% пациентов обратились впервые. Общая продолжительность заболевания составила $17,7 \pm 1,8$ месяцев.

При анализе эффективности проводимого лечения были получены следующие результаты. 1 группа: через 2 недели клиническая картина оставалась без изменений, два пациента на визит не пришли. На этом визите клинически значимых изменений нет, однако ни у одного пациента не зарегистрировано но-

вых элементов или увеличения размеров уже существующих поражений кожи. На промежуточном визите (через 2 недели от начала приема БАД с индол-3-карбинолом) всем пациентам этой группы проведена криодеструкция. К визиту 2 рецидивов и появления новых элементов не выявлено, однако у четырех больных оставались единичные бородавки, размер которых не увеличился. Таким образом, не отмечено влияния БАД с индол-3-карбинолом на уже существующие бородавки, однако и возникновение новых элементов не было выявлено.

Во второй группе пациентов уже через 2 недели оставались розовые застойные пятна в местах наибольшего поражения, отмечалось полное исчезновение мелких элементов; резкий регресс при наиболее выраженных поражениях отметили у 33,3% пациентов, из них половине (16,6%) была проведена криодеструкция. Не пришли через 2 недели в связи с полным исчезновением бородавок 25% пациентов. Через 3 месяца ни-

кто из пациентов жалоб на поражения кожи не предъявлял, однако у одного пациента остались единичные высыпания, а у одного – застойное бледно-розовое пятно. Через 6 месяцев рецидивов или новых элементов не выявлено (рис. 2).

В 3 группе через 2 недели у 50% пациентов сохранялись выраженные пятна сине-багрового цвета, корочки и остаточные высыпания, которые разрешились лишь к $46,3 \pm 6,3$ дню, к визиту 3 бородавки у них полностью исчезли, у одного пациента осталось розовое пятно. Через 6 месяцев рецидивов или подсыпания новых элементов не наблюдалось (рис. 4, иллюстрации 1, 2, 3).

При телефонном контакте с пациентами, проводившемся раз в 2 недели, выяснилось, что при комбинированном использовании (БАД с индол-3-карбинолом + циклоферон + реаферон) срок разрешения папилломатозных очагов составил 1–1,2 месяца в отличие от пациентов, в лечении которых использовалась комбинация (циклоферон + реаферон). У них сроки разрешения составили 2,5–3 месяца.

Оценка эффективности и удобства лечения самими пациентами была такой же, как и у пациентов блока I.

Таким образом, было показано, что комбинация (БАД с индол-3-карбинолом + реаферон + циклоферон) более эффективна, чем терапия реафероном и циклофероном. Комбинация (БАД с индол-3-карбинолом + реаферон + циклоферон) достоверно сокращает сроки разрешения ВПЧ-инфекции кожи (почти в 2,5 раза) по сравнению с терапией реафероном в комбинации с циклофероном. Назначение БАД с индол-3-карбинолом в качестве единственного средства при папиллома-вирусной инфекции кожи не привело к выраженным клинически значимым улучшениям, однако через

6 месяцев ни у одного из пациентов не отмечилось рецидива заболевания. Комбинированное лечение (БАД с индол-3-карбинолом + реаферон + циклоферон) сокращает частоту проведения криодеструкции. Нежелательных явлений при применении как интерферонов и их индукторов, так и БАД с индол-3-карбинолом выявлено не было.

Обсуждение результатов

Несмотря на то, что в исследовании участвовали пациенты с различными проявлениями папилломатоза, идея исследования была общей – оценить влияние БАД с индол-3-карбинолом на течение различных вариантов ПВИ, определить его эффективность и безопасность, а также оценить его противорецидивное влияние. В исследованиях блока I и II показано, что сроки разрешения проявлений ПВИ достоверно сокращаются при присоединении БАД с индол-3-карбинолом. Мы намеренно не стали объединять всех пациентов в одну группу по причине различной тактики лечения папилломатоза, которую выбрали врачи-исследователи.

Было отмечено, что после проведения деструкции кондилом с дальнейшим использованием индол-3-карбинола в качестве единственного средства не отмечалось появления новых элементов на протяжении 10 месяцев, что, разумеется, не потребовало повторного проведения деструкции. Также было отмечено, что при ПЦР-исследовании у пациентов, получавших БАД с индол-3-карбинолом, ВПЧ не обнаруживался в сроки достоверно гораздо более ранние по сравнению с лечением без БАД с индол-3-карбинолом, где в 50% случаев добиться отрицательных результатов ПЦР-анализа не удалось.

Насколько же существует необходимость в элиминации ВПЧ?

При выявлении высокоонкогенных типов ВПЧ при проведении ПЦР-анализа пациенту придется регулярно проходить подобные обследования, возможны рецидивы болезни, а также существует риск заражения партнеров. Подобная ситуация вызывает психологический дискомфорт у больных (регулярные визиты к врачу, страх онкозаболевания, опасность заразить партнера). Несмотря на то, что аногенитальные кондиломы и результаты ПЦР на ВПЧ в мазках, вероятно, имеют различные субтипы ВПЧ, БАД с индол-3-карбинолом продемонстрировал сравнимую эффективность в обоих случаях. Не исключено, что разные субтипы ВПЧ по-разному поддаются лечению.

На фоне проведения стандартной иммунотерапии было отмечено возникновение новых элементов, потребовавших деструкции. Частая смена препаратов интерферона и иммуномодуляторов на протяжении исследования, к сожалению, не гарантировала от появления новых высыпаний и элиминации ВПЧ по результатам ПЦР, при этом необходимость в парентеральном использовании препаратов и повторные деструктивные мероприятия были обременительны для больных.

Несколько другие результаты были получены при лечении вульгарных, плоских и подошвенных бородавок. Использование БАД с индол-3-карбинолом в качестве единственного препарата не повлияло на эти проявления ПВИ, хотя не отмечено и появления новых элементов на протяжении 6 месяцев наблюдения, в связи с чем всем пациентам этой группы была проведена криодеструкция. При комбинированном использо-

вании индол-3-карбинола с препаратами интерферона отмечено более быстрое исчезновение папилломатозных проявлений по сравнению с использованием препаратов интерферона без индол-3-карбинола. При использовании препаратов интерферона отмечено значительно более медленное исчезновение папилломатозных проявлений по сравнению с лечением комбинацией препаратов интерферона вместе с БАД с индол-3-карбинолом, к тому же этим пациентам реже проводилась криодеструкция.

Что касается исследования противорецидивной активности, то после окончания исследования пациенты находились под наблюдением еще от 3 до 5 месяцев. За это время были эпизоды рецидива у 3-х пациентов. Это были случаи, когда пациенты не использовали БАД с индол-3-карбинолом: 1 случай – появления новых элементов, 2 случая – обнаружения ВПЧ при ПЦР-исследовании. По мнению одного из исследователей, обнаружение ВПЧ в мазках из мочеиспускательного тракта у одного из этих пациентов было не рецидивом, а повторным заражением, так как сопровождалось выявлением ИППП, ранее не выявляемых.

Учитывая специфические клинические проявления ПВИ, следует считать, что субтипы ВПЧ, их вызвавшие, обладали низким онкогенным потенциалом. Обнаружение высокоонкогенных субтипов было подтверждено только ПЦР-исследованием без клинических проявлений. В данном аспекте одним из путей реализации эффектов индол-3-карбинола следует считать его способность индуцировать апоптоз и препятствовать размножению вирусов. Другие механизмы, такие как блокирование онкобелков E6 и E7 и смещение метаболизма эстрадиола, не имели клинического значения в связи с

отсутствием точки приложения для реализации этих эффектов.

Авторы делают вывод, что комбинация индол-3-карбинола с иммунными препаратами является наиболее предпочтительной и эффективной, чем использование препаратов интерферона с иммуномодуляторами. Присоединение БАД с индол-3-карбинолом к иммунным препаратам следует рекомендовать после проведения деструкции папилломатозных очагов независимо от способа ее проведения. Исследователям не удалось отдать предпочтение в эффективном преимуществе того или иного иммунного препарата, назначенного вместе с индол-3-карбинолом. БАД с индол-3-карбинолом может быть использован в качестве единственного средства, если у пациента имеются указания на выявление ВПЧ при ПЦР при отсутствии каких-либо других проявлений папилломатоза.

Несмотря на яркие положительные стороны этого исследования, подтвержда-

ющие эффективность индол-3-карбинола, был отмечен и ряд недостатков, таких как: небольшое количество пациентов в группах, короткий период наблюдения (5–10 месяцев), отсутствие исследования иммунного статуса пациентов.

Выводы

БАД с индол-3-карбинолом может быть рекомендован в комплексе с иммунными препаратами при лечении остроконечных кондилом, вульгарных, плоских, подошвенных бородавок после проведения деструктивных мероприятий. Локальное введение препаратов интерферона в очаги поражения совместно с пероральным приемом индол-3-карбинола позволяет избежать деструктивных мероприятий. Использование БАД с индол-3-карбинолом в качестве единственного средства возможно при обнаружении ВПЧ при проведении ПЦР-исследования без клинических проявлений ПВИ.

Список литературы

1. *Башмакова М. А., Савичева А. М.* Папилломавирусная инфекция. Пособие для врачей. <http://www.medeage/papillomi.pdf> <http://www.medeage/papillomi.pdf>

2. *Гомберг М. А., Соловьев А. М.* Лечение поражений аногенитальной области, вызванных папилломавирусной инфекцией // Вестник дерматологии и гинекологии. 1998. №3. С. 22–26.

3. *Евстигнеева Н. П.* Папилломавирусная инфекция урогенитального тракта женщин: эпидемиология, факторы персистенции, оптимизация диагностики и профилактики онкогенеза. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. М., 2007. <http://vak.ed.gov.ru/announcements/medicin/EvstigneevaNP.doc>

4. *Киселев В. И., Ашрафян Л. А., Бударина С. О., Киселев О. И., Пальцев М. А., Кула-*

ков В. И., Прилепская В. Н. Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки: генетические и патогенетические механизмы, возможности терапии и профилактики // Consilium medicum. Гинекология. 2004. Т. 06, № 4.

5. *Киселев В. И., Ляшенко А. А.* Молекулярные механизмы регуляции гиперпластических процессов. М.: Димитрейд График Групп, 2005.

6. *Кулаков В. И.* Папилломавирусная инфекция гениталий у женщин. Учебное пособие. М.: 2007.

7. *Левин Д. В.* Лечение инфекции ВПЧ: настоящее и будущее (обзор зарубежной литературы) // Инфекции, передаваемые половым путем. 2004. №4, http://www.kondiloma.ru/article_01.phtml

8. *Роговская С. И.* Апоптоз при патологии шейки матки, ассоциированной с вирусом

папилломы человека // Гинекология. 2000. Т. 2, №3. С. 1121–1123.

9. **Роговская С. И.** Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки. Руководство для практикующего врача. М.: Гэотар-Медиа, 2005.

10. **Соловьев А. М.** Консервативная терапия поражений, вызванных папилломавирусной инфекцией // Лечащий Врач. 2003. № 07. С. 23–26.

11. **Bovee T. F., Schoonen W. G., Hamers A. R., Bento M. J., Peijnenburg A. A.** Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities // PMID: 18188547 [PubMed – as supplied by publisher]

12. **Bradlow H. L. et al.** Long-responses of women to indol-3-carbinol // Cancer Epidemiol. Biomarkers prev. 1994. Vol.7. P. 591–595.

13. **Kimberlin D. W.** Pharmacotherapy of recurrent respiratory papillomatosis // ID: 11031411 [PubMed - indexed for MEDLINE]

14. **Liu H., Wormke M., Safe S. H., Bjeldanes L. F.** Indolo[3,2-b]carbazole: a dietary-derived factor that exhibits both antiestrogenic

and estrogenic activity // PMID: 7966413 [PubMed – indexed for MEDLINE]

15. **Rosen C. A., Bryson P. C.** Indole-3-carbinol for recurrent respiratory papillomatosis: long-term results // PMID: 15193659 [PubMed - indexed for MEDLINE]

16. **Reidy P. M., Dedo H. H., Rabah R., Field J. B., Mathog R. H., Gregoire L., Lancaster W. D.** Integration of human papillomavirus type 11 in recurrent respiratory papilloma-associated cancer. // PMID: 15510012 [PubMed – indexed for MEDLINE]

17. **Stephensen P. U., Bonnesen C., Schalldach C., Andersen O., Bjeldanes L. F., Vang O.** N-methoxyindole-3-carbinol is a more efficient inducer of cytochrome P-450 1A1 in cultured cells than indol-3-carbinol // PMID: 10798223 [PubMed – indexed for MEDLINE]

18. **Stephen A. M. et al.** Atlas of Sexually transmitted Diseases. Mosby, 2003. P. 261–268.

19. **Steven W. P., Joshua J. P.** Лечение бородавок // <http://www.medafarm.ru>. Источник. PharmD US Pharmacist. 2005. Vol.30, №4.

20. **Wiatrak B. J.** Overview of recurrent respiratory papillomatosis // PMID: 14631175 [PubMed - indexed for MEDLINE]

New clinical-pharmacology methods in therapy of epidermal manifestation of human papilloma viral skin infection

N. G. Berdnikova, D. A. Fartukh, V. N. Ivanova, V. G. Sorokin

Study of efficiency and safety on the biologically active nutrient (BAA) containing indole-3-carbinol (I-3-C) in composition complex therapy and relapse of epidermal manifestation of viral papilloma infections shows that BAA with I-3-C reduced for sure progress and appearance of new elements anogenital condylomatosis and also promote more quickly elimination of human papilloma viral skin infection.

Key words: indole-3-carbinol, epidermal viral papilloma infections, human papilloma viral skin infection, interferon.

Оценка клинической эффективности рабепразола в зависимости от индивидуального типа рецепции париетальных клеток при различных кислотозависимых заболеваниях желудка и двенадцатиперстной кишки

А. К. Стародубцев, С. П. Федоров, С. Ю. Сереброва,
С. Н. Кондратенко, Г. А. Белякова

Институт клинической фармакологии ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора, Москва

Контактная информация: e-mail: elmed@yandex.ru

Влияние 20 мг рабепразола на желудочную кислотопродукцию изучено у 40 больных с гиперацидным гастритом (12 женщин и 28 мужчин; $33,3 \pm 6,7$ лет) и у 20 больных, перенесших резекцию желудка и нуждающихся в антисекреторной терапии (15 мужчин и 5 женщин; $51,6 \pm 5,4$ лет). Назначение ранидина (или фамотидина) в течение недели в стандартной дозе было неэффективным у всех больных. 6 пациентам с неуточненным типом рецепции в течение недели без эффекта назначался пирензепин. После начала применения рабепразола по 20 мг в сутки жалобы исчезли у всех больных через 1–2 дня. Таким образом, рабепразол обладает большим по сравнению с другими ингибиторами протонной помпы антисекреторным эффектом, его действие не зависит от индивидуального типа рецепции обкладочных клеток желудка.

Ключевые слова: рабепразол, ингибиторы протонной помпы, тип рецепции обкладочных клеток желудка, рН-метрия, резекция желудка.

Проблема диагностики и лечения кислотозависимых заболеваний пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки как никогда становится актуальной в настоящее время. К данной группе относятся заболевания, при которых имеется доказанная связь с агрессивным влиянием эндогенной соляной кислоты. Язвенная болезнь, прежде всего при дуоденальной локализации, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, функциональная диспепсия язвенноподобного типа, симптоматические эндокринные язвы (синдром Золлингера–Эллисона, язвы при гиперпаратиреозе) являются кислотозависимыми состояниями, поскольку их объединяет общее патогенетическое звено – кислотная агрессия желудочного сока, и в основе их лечения лежит антисекреторная терапия [2, 9, 11].

В последние десятилетия наблюдалось появление и бурное развитие новых методов фармакологической блокады внутрижелудочной кислотопродукции. Благодаря клиническим исследованиям установлено, что между заживлением язвы и способностью лекарственных препаратов подавлять кислотность существует прямая зависимость. Поэтому при заболеваниях, в патогенезе которых повышение желудочной секреции соляной кислоты является пусковым механизмом повреждения слизистой оболочки, управление кислотопродукцией является важной задачей лекарственной терапии. Заживление язвы детерминировано не только продолжительностью назначения того или иного антисекреторного средства, но и его способностью удерживать интрагастральный рН

выше 3 в течение заданного времени. Язва двенадцатиперстной кишки заживает за 4 недели в 100% (!) случаев, если поддерживать интрагастральный рН выше 3 на протяжении 18–20 часов в течение суток. Язва желудка характеризуется более медленным заживлением, чем дуоденальная, поэтому применение антисекреторных препаратов должно быть более продолжительным. Предполагается, что мы вправе ожидать рубцевания язвы желудка в 100% случаев, если интрагастральный рН поддерживается выше 3 на протяжении 18 часов в сутки в течение около 8 недель [8, 10].

Многoletние исследования возможностей фармакологического воздействия на секрецию соляной кислоты привели к эволюции лекарственных средств, результатом чего стало повышение их эффективности, селективности, а следовательно, и безопасности.

Длительное время задачу снижения внутрижелудочной гиперацидности выполняли М-холинолитики и H_2 -блокаторы гистаминовых рецепторов [13].

Холинолитики снижают кислотную продукцию, тормозят освобождение гастрина, уменьшают выработку пепсина, пролонгируют эффект антацидных средств, усиливают буферные свойства пищи, уменьшают двигательную активность желудка и 12-перстной кишки. В то же время применение при лечении язвенной болезни таких препаратов, как атропин, платифиллин и метацин, является ограниченным из-за системности их холиноблокирующего действия и, как следствие этого, высокой частоты нежелательных реакций. Атропин и атропиноподобные препараты противопоказаны при глаукоме, аденоме предстательной железы, сердечной недостаточности. Их прием нежелателен при

недостаточности кардии и гастроэзофагеальных рефлюксах, которые часто сопутствуют язвенной болезни, поскольку в таких случаях может усиливаться обратный заброс кислого желудочного содержимого из желудка в пищевод. Кроме того, в последние годы было установлено, что противоязвенная активность традиционных (неселективных) холинолитиков является недостаточной и непродолжительной [1, 7, 20].

Итак «краеугольный камень» лечения всех кислотозависимых заболеваний – кислотоснижающая терапия современными антисекреторными препаратами. Достаточно долгое время (около 20 лет) с середины 70-х годов золотым стандартом лечения кислотозависимых заболеваний по праву считались H_2 -блокаторы гистаминовых рецепторов, за синтез которых Г. Дэйлу в 1988 году была присуждена Нобелевская премия. В свое время это привело к революционному прорыву в лечении. Однако в настоящее время они ушли на второй план. К основным факторам, ограничивающим клиническое применение H_2 -блокаторов гистаминовых рецепторов в настоящее время относят недостаточный и непродолжительный антисекреторный эффект, торможение в основном базальной и ночной секреции, резистентность к лечению у 5–20% популяции, быстрое развитие толерантности и утрату антисекреторного эффекта, достаточно высокий уровень побочных эффектов при длительном применении [15, 16, 17].

Представители названных групп препаратов, воздействуя на соответствующие рецепторы, делают недоступным только один из путей передачи сигнала ферменту, транспортирующему ионы водорода в просвет желудка, что предопределяет возможность функциони-

рования иных, «запасных», механизмов стимуляции кислотообразования [3, 4]. Этим можно объяснить не только случаи неэффективности применения блокаторов того или иного типа рецепторов, но отчасти и сохранение у ряда пациентов высокой интенсивности внутрижелудочной кислотопродукции после резекции желудка и различных вариантов ваготомии.

Была выдвинута идея об индивидуальном типе рецепции обкладочных клеток желудка, согласно которой чувствительность одного из видов рецепторов обычно преобладает над другими, определяя ведущий механизм стимулирования кислотопродукции у каждого пациента. Доказана возможность изменения типа рецепции в течение года у одного и того же индивидуума [3, 4, 12]. Таким образом, назначение блокаторов того или иного типа рецепторов должно быть обоснованным предварительным проведением фармакологических проб с этими препаратами. Необходимость применения медикаментозных тестов подтверждается и другими исследователями [5].

С появлением ингибиторов протонной помпы («proton pump inhibitors», PPIs) данная проблема потеряла актуальность, так как мишенью этих лекарственных средств является последнее, единое, интегральное при любом способе стимулирования кислотопродукции, звено в цепи рецептор – метаболизм – генерация H^+ – проход через ионный канал в просвет желудка. Прототипом данного класса является дериват бензимидазола – омепразол, который был синтезирован в 1979 г., а применяться стал с 1988 года. Ингибиторы протонной помпы обладают выраженным угнетающим действием на базальную, ночную,

стимулированную секрецию [14, 18, 20, 21], у пациентов раньше исчезают жалобы, быстрее протекают репаративные процессы на слизистой оболочке, число осложненных форм существенно уменьшается [22]. Высокая безопасность представителей данной фармакологической группы связана с их способностью активироваться только в средах с низкими цифрами pH, в основном в секреторных канальцах париетальных клеток [6, 23].

Среди препаратов рассматриваемой фармакологической группы наибольший интерес представляет рабепразол. На примере рабепразола – наиболее современного препарата-представителя самой эффективной группы антисекреторных средств мы хотели продемонстрировать блестящие возможности применения ингибиторов H^+/K^+ -АТФазы в случаях, когда использование блокаторов того или иного типа рецепторов нерезультативно из-за игнорирования необходимости предварительного тестирования чувствительности к ним соответствующих рецепторов, а также в ситуациях, когда выбор препарата ограничивается хирургическим устранением одного из механизмов стимуляции кислотообразования в желудке.

Цель и задачи исследования: сравнительное изучение антисекреторной активности и клинической эффективности рабепразола у пациентов с гиперацидным гастритом при различных вариантах преобладающей чувствительности рецепторов слизистой оболочки и у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки с сохраняющейся после резекции желудка или ваготомии высокой интенсивностью кислотообразования.

Материалы и методы

Определение антисекреторной активности рабепразола у больных с гастритом, протекающим на фоне повышенной внутрижелудочной кислотопродукции и с различным индивидуальным преобладающим типом рецепции обкладочных клеток слизистой оболочки желудка, проводилось с помощью внутрижелудочной телерадио-pH-метрии на фоне однократного приема 20 мг рабепразола. Исследование проведено у 40 больных (12 женщин и 28 мужчин в возрасте $33,3 \pm 6,7$ лет) с выявленным при эндоскопическом (эндоскопические признаки гастрита даны в соответствии с номенклатурой OMED) и гистологическом исследовании гастритом. Дополнительным условием проведения изучения типа рецепции обкладочных клеток желудка и продолжительности антисекреторного эффекта рабепразола была высокая интенсивность кислотопродукции, выявляемая при внутрижелудочной pH-метрии (40 человек из 67 обследованных). Определение индивидуального типа рецепции обкладочных клеток слизистой оболочки желудка проводилась по методике Е. В. Селиной [6], основанной на изучении динамики pH при последовательном применении H_2 -гистаминоблокаторов и М-холиноблокаторов. Применялись медикаментозные тесты для четкой дифференциации работы основных рецепторов обкладочных клеток слизистой оболочки желудка, определяющих образование соляной кислоты – М-холинергических и H_2 -гистаминергических.

Пристеночный pH в желудке и ИТРОКЖ определялся с помощью телерадио-pH-метра фирмы «Телефункен», (Германия) с использованием радиокапсулы «Heidelberger», Сименс-Элема,

(Швеция). Больному натошак предлагалось проглотить, запивая 30 мл воды, откалиброванную радиокапсулу, фиксированную на нити, свернутой предварительно в комочек и помещенной в полость рта вместе с капсулой. Длина нити равна измеренной при ЭГДС длине пищевода пациента + 5 см. Уровень пристеночного pH в базальных условиях записывается в течение 15 минут. Интенсивность базального кислотообразования определялась как:

высокая – $pH \leq 2,0$ (гиперацидность);
средняя – $pH 2,0-3,0$ (нормаацидность);

низкая – $pH 3,0-6,0$ (гипоацидность);
анацидность – $pH 6,0-7,0$;
ахилия – pH больше 7,0.

Далее больным вводился ранитидин – 150 мг. Через 2 часа измерялся уровень pH. Если за это время уровень pH повышался самостоятельно или при использовании стандартного содового теста (сода нейтрализует адсорбированные на слизистой оболочке ионы водорода) и в дальнейшем длительно (более 30 минут) не снижался даже при дополнительном стимулировании кислотопродукции (мясной бульон), то такой тип рецепции соответствовал H_2 -гистаминергическому индивидуальному типу рецепции обкладочных клеток желудка. В случае если не происходило стабильного повышения пристеночного pH больше 3,0, и значения pH после проведения содового теста в течение нескольких минут возвращались к исходному уровню, это говорило о том, что у больного негистаминергический тип рецепции.

На следующий день телерадио-pH-метрия повторялась на фоне приема 50 мг пирензепина. Уровень pH измерялся через 3 часа после приема препарата.

Пациенты, у которых проводилась 24-часовая внутрижелудочная рН-метрия на фоне стандартных доз омепразола и лансопразола

Препарат	Омепразол	Лансопразол
Доза	20 мг	30 мг
Количество пациентов	20 (10 муж., 10 жен.)	20 (10 муж., 10 жен.)
Возраст	36,0 ± 8,5 лет	35,4 ± 7,7 лет

Если в течение этого времени рН повышался самостоятельно или при использовании содового теста и в дальнейшем длительно (более 30 минут) не снижался даже при дополнительном стимулировании кислотообразования, то такой тип рецепции соответствовал М-холинергическому индивидуальному типу рецепции обкладочных клеток желудка.

В тех же случаях, когда на фоне тестов с H₂-гистаминоблокаторами и М-холиноблокаторами не происходило стабильного повышения уровня пристеночного рН больше 3,0, то такой тип рецепции расценивался как вариант рецепции неуточненного характера в связи с тем, что мы пока не имеем возможности с помощью фармакологических проб тестировать все виды рецепторов, находящихся на мембране обкладочных клеток (в частности, гастриновые рецепторы). Таким образом, варианты индивидуального типа рецепции обкладочных клеток желудка:

- H₂-гистаминергический тип,
- М-холинергический тип,
- Неуточненный тип.

Через 2 дня внутрижелудочная рН-метрия повторялась. Определялся базальный уровень рН, затем пациент принимал 1 таблетку (20 мг) рабепразола. Измерения рН проводились через каждые 0,5 ч в течение 12 часов. Во время исследования все пациенты дважды принимали пищу не раньше 4 и не позднее

8 часов после приема препарата (через 1 час после достижения максимального рН). Через 24 часа оценивали базальный уровень рН₂₄ и стимулированный (мясной бульон) рН_{стимулир.24*}

Аналогичное исследование (суточная внутрижелудочная рН-метрия без фармакологического тестирования блокаторами H₂-гистаминовых и М-холинергических рецепторов) проводилось у пациентов с гастродуоденитом на фоне приема стандартных доз омепразола и лансопразола. Характеристика этих групп представлена в таблице 1.

Определение клинической эффективности рабепразола у больных, нуждающихся в антисекреторной терапии, перенесших резекцию желудка, проведено у 20 больных (15 мужчин и 5 женщин в возрасте 51,6±5,4). Сроки после перенесенной операции составили 5,7±3,5 лет.

Показанием к исследованию были жалобы больных, характерные для состояния гиперацидности. У всех больных при ЭГДС выявлен подтвержденный морфологически диагноз гастрит культи желудка и высокая интенсивность внутрижелудочной кислотопродукции в базальных условиях. Выполнялась внутрижелудочная рН-метрия с определением индивидуального типа рецепции обкладочных клеток желудка по вышеописанной методике. В последующем для обоснования важности проведения фармакологических проб с

блокаторами H_2 -гистаминергических и М-холинергических рецепторов до начала их курсового приема больным с преобладающим H_2 -гистаминергическим или М-холинергическим типом рецепции в течение недели в I случае назначался пирензепин по 50 мг 2 раза в сутки, а во II случае – ранитидин по 150 мг 2 раза в сутки (или фамотидин 40 мг в сутки) соответственно. Затем всем пациентам назначался рабепразол по 20 мг в сутки. Больным с неуточненным преобладающим типом рецепции назначались ранитидин по 150 мг (или фамотидин 40 мг в сутки) в течение недели, затем пирензепин по 50 мг 2 раза в сутки также в течение недели. В последующем больные принимали рабепразол по 20 мг в сутки.

Эффективность терапии оценивалась через неделю от начала приема всех перечисленных препаратов по динамике жалоб и изменению самочувствия, которое больной оценивал по 10-балльной визуально-аналоговой шкале по окончании 1-недельного курса терапии каждым из перечисленных препаратов.

Результаты исследования

Определение антисекреторной активности рабепразола у больных с гастритом, протекающим с повышением внутрижелудочной кислотопroduкции.

Результаты изучения индивидуального типа рецепции обкладочных клеток слизистой оболочки желудка у включенных в исследование лиц представлены на рис. 1.

Таким образом, преобладание чувствительности H_2 -гистаминовых рецепторов определено у 32

больных, М-холинорецепторов у 6 больных, у 2 больных тип рецепции расценен как неуточненный.

Результаты 24-часового мониторингирования внутрижелудочного рН на фоне приема рабепразола 20 мг в сопоставлении с аналогичным исследованием у больных с гастродуоденитом на фоне однократного приема омепразола 20 мг и лансопразола 30 мг представлены в табл. 2.

Проводился сравнительный анализ латентного периода (время от момента приема препарата до повышения внутрижелудочного рН > 3,0), максимального рН и рН (базального и стимулированного) через 24 часа после приема препарата.

В группе пациентов, принявших рабепразол 20 мг, оцениваемые показатели (латентный период, pH_{max} , $pH_{24ч}$, $pH_{стимулир.24ч}$) не зависели от преобладающей чувствительности того или иного вида рецепторов, наблюдалось длительное защелачивание внутрижелудочного содержимого (повышение $pH > 3$), сохранявшееся более 24 часов от момента приема препарата. Величины pH_{max} , $pH_{24ч}$, $pH_{стимулир.24ч}$, характеризующие выраженность и продолжительность антисекреторного эффекта рабепразола, были достоверно выше, чем на фоне приема стандартных доз омепразола и лансопразола.

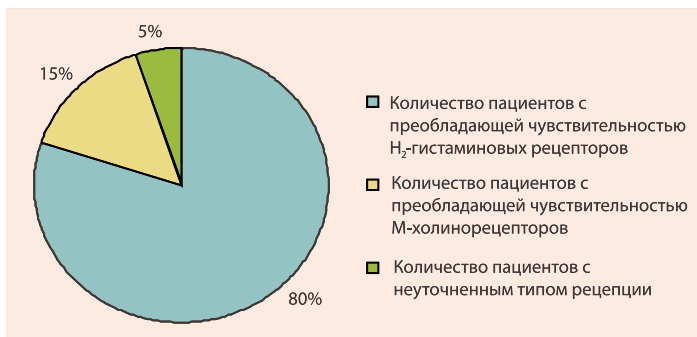


Рис. 1. Преобладающая чувствительность различных видов рецепторов у пациентов с гастритом

Время наступления, выраженность и продолжительность эффекта рабепразола, омепразола, лансопразола, назначаемых однократно в стандартных дозах

Препарат	Рабепразол, 20 мг	Омепразол, 20 мг	Лансопразол, 30 мг	p
Число пациентов	40	20	20	
Латентный период, ч	3,1 ± 0,5	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,6	p рабепр., ланс.; p рабепр., омепр. < 0,05
pH _{max}	5,4 ± 0,7	4,0 ± 0,3	4,3 ± 0,6	p рабепр., ланс.; p рабепр., омепр. < 0,05
pH _{24ч}	3,5 ± 0,4	2,4 ± 0,3	2,6 ± 0,3	p рабепр., ланс.; p рабепр., омепр. < 0,05
pH _{стимулир.24ч}	3,0 ± 0,7	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,3	p рабепр., ланс.; p рабепр., омепр. < 0,05

Определение клинической эффективности рабепразола у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, нуждающихся в антисекреторной терапии, перенесших резекцию желудка.

При выполнении внутрижелудочной рН-метрии из 20 человек ни у одного больного, перенесшего резекцию желудка, не выявлено преобладание активности H₂-рецепторов. У 14 пациентов выявлена преобладающая чувствительность М-холинорецепторов, у 6 пациентов тип рецепции оценен как неуточненный (рис. 2).

Всем 20 пациентам назначался ранитидин (или фамотидин) в течение недели, однако динамики жалоб не наблюдалось ни у одного больного. Изменения субъективной оценки самочувствия представлены на рис. 3. Следует

отметить, что у 3 пациентов субъективная оценка самочувствия на фоне применения H₂-гистаминоблокаторов была ниже, чем до начала лечения, однако при расспросе эти пациенты никаких дополнительных жалоб не предъявляли. Это могло быть связано с эмоциональной реакцией в связи с неоправдавшимся ожиданием улучшения.

Пациентам с неуточненным типом рецепции (6 человек) еще в течение 1 недели назначался гастроцепин. Статисти-

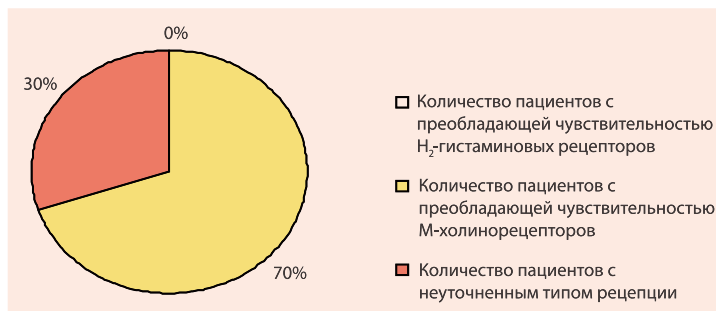
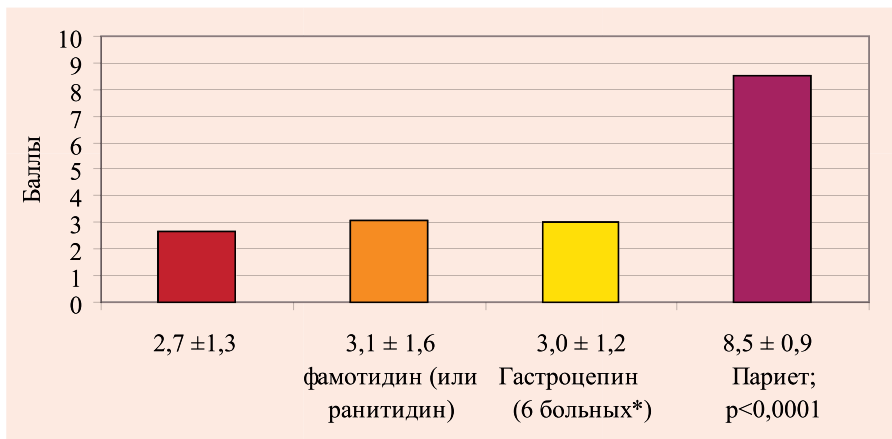


Рис. 2. Преобладающая чувствительность различных видов рецепторов у пациентов, перенесших резекцию желудка



* — гастропепсин назначался только пациентам с неуточненным типом рецепции

Рис. 3. Оценка самочувствия у пациентов, перенесших резекцию желудка

чески значимой динамики оценки самочувствия также не наблюдалось.

После начала приема рабепразола по 20 мг в сутки жалобы у всех пациентов исчезали через 1–2 дня после начала применения ингибитора протонной помпы.

Таким образом, у изучаемой категории пациентов продемонстрирована неэффективность H_2 -блокаторов. У пациентов с неуточненным типом рецепции неэффективно также применение М-холиноблокаторов. Рабепразол оказался высокоэффективным антисекреторным средством для лечения больных с интенсивной внутрижелудочной кислотопродукцией, перенесших резекцию желудка.

Список литературы

1. Бендиков Э. А., Логинов А. С., Сильвестрова С. Ю. и др. Клиническая фармакокинетика гастропепина, циметидина и ранитидина. Новые возможности в лечении гастропепином // Материалы симпозиума. 30 мая 1985 г. М., 1985. С. 7–22.

2. Васильев Ю. В. Язвенная болезнь // Трудный пациент. 2003. Т. 1, №2. С. 6–7.

Выводы

1) Рабепразол, назначаемый в стандартной дозе (20 мг), обладает более выраженным и продолжительным антисекреторным эффектом, чем стандартные дозы омепразола (20 мг) и лансопразола (30 мг).

2) Продолжительность и выраженность антисекреторного эффекта рабепразола не зависит от индивидуальной преобладающей чувствительности того или иного типа рецепторов обкладочных клеток слизистой оболочки желудка.

3) Рабепразол – высокоэффективный препарат для лечения нуждающихся в антисекреторной терапии пациентов, перенесших резекцию желудка.

3. Желябовская С. В. Сравнительная фармакодинамика основных антагонистов H_2 -гистаминовых рецепторов разных поколений. Дисс. ... канд. мед. наук. М., 1999.

4. Журавлева М. В. Клиническая фармакология блокаторов H_2 -гистаминовых рецепторов. Дисс. ... докт. мед. наук. М., 2000.

5. Зайцев В. Т., Бойко В. В., Лагода А. Е. Гистодиловый тест в исследовании желудоч-

ной секреции // Лаб. Дело. 1991. № 7. С. 72–73.

6. **Звартау Э. Э., Рысс Е. С.** Фармакотерапия гастродуоденальных язв. СПб.: Наука, 1992.

7. **Лапина Т. Л.** Язвенная болезнь: возможности лечения на пороге нового века // Consilium medicum. 2000. Т. 2, №7.

8. **Ивашкин В. Т.** Гастродуоденальная патология и *Helicobacter pylori* // Русский медицинский журнал. 1995. №2. С. 18–19.

9. **Кубышкин В. А., Корняк Б. С.** Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь. М., 1999. 189 с.

10. **Логинов А. С., Аруин Л. И., Ильченко А. А.** Язвенная болезнь и *Helicobacter pylori* // Материалы VIII тематической сессии Российской группы по изучению *Helicobacter pylori*, 18 мая 1999. Уфа, 1999. С. 23–25.

11. **Минушкин О.** Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки // Фармацевтический вестник. 2002.

12. **Селина Е. В.** Фармакокинетика и фармакодинамика фамотидина. Дисс. ... канд. мед. наук. М., 1988.

13. **Хаммер Р., Жиралдо Е., Гьячетти А.** Пиренцепин — первый антагонист М-рецепторов. Селективная блокада мускариновых рецепторов — новый принцип лечения пептических язв // Материалы симпозиума. Москва, 2 февраля 1983 г. М., 1983. С. 7–16.

14. **Atanassoff P. G., et al.** The time course of gastric pH changes induced by omeprazole and ranitidine: a 24-hour dose-response study

// Anesth. Analg. 1995. Vol.80, №5. P. 975–979.

15. **Earnest D. L., Robinson M.** Treatment advances in acid secretory disorders: the promise of rapid symptom relief with disease resolution // Am. J. Gastroenterol. 1999. Vol.94(11 Suppl). P. 17–24.

16. **Jirasek V.** Drugs affecting gastric acidity in the therapy of ulcer disease // Lky ovlivnující žaludeční aciditu v terapii vredové nemoci // Vnitř-Lek. 1995. Vol.41, №3. P. 179–81.

17. **Jirasek V.** Drugs affecting gastric acidity in the therapy of ulcer disease // Vnitř-Lek. 1995. Vol.41, № 3. P. 179–181.

18. **Mignon M., Galmiche J. P.** Safe effective control of acid secretion. London, 1988.

19. **Modlin I. M., Sachs G.** Acid related diseases: biology and treatment. – Schnetztor – Verlag GmbH D – Konstanz, 1998. P. 197–241.

20. **Rackoff A. et al.** Histamine-2 receptor antagonists at night improve gastroesophageal reflux disease symptoms for patients on proton pump inhibitor therapy // Diseases of the Esophagus. 2005. Vol.18, № 6. P. 370–373.

21. **Reilly J. P.** Safety profile of the proton pump inhibitors // Am. J. Health. Syst. Pharm. 1999. Vol.56, №23. P. 11–17.

22. **Richardson P., Hawkey C. J., Stack W. A.** Proton pump inhibitors. Pharmacology and rationale for use in gastrointestinal disorders // Drugs. 1998. Vol.56, №3. P. 307–335.

23. **Wurst W., Hartmann M.** Current status of acid pump antagonists (reversible PPIs) // Yale-J. Biol. Med. 1996. Vol.69, №3. P. 233–243.

Clinical efficiency of a rabeprazole depending on individual type of gastric parietal cell reception in patients with different acid-dependent diseases of stomach and duodenum

A. K. Starodubtzev, S. P. Fedorov, S. Yu. Serebrova, S. N. Kondratenko, G. A. Belyakova

An influence of rabeprazole (20 mg) on intragastric acid production was studied in patients with hypergastric gastritis (40 patients: 12 women and 28 men aged 33,3±6,7 years) and in 20 patients (15 men and 5 women aged 51,6±5,4) after gastric resection, needing antisecretory therapy. All the patients were administered ranitidine (or famotidine) during one week with no clinical effect. Six patients with unclear reception type were given gastrozepine for one more week, with no effect either. After the beginning of rabeprazole 20 mg a day complaints disappeared in all patients within one or two days. Conclusion: rabeprazole possesses higher antisecretory effect^{vs}. other proton pump inhibitors, unlike that of H₂ histamine blockers, the latter not depending on the individual type of gastric parietal cell reception.

Key words: rabeprazole, proton pump inhibitors, individual type of gastric parietal cell reception, pH-metry, stomach resection.



Качественная лабораторная практика (GLP): здания и сооружения Научного центра биомедицинских технологий РАМН

Г. Д. Капанадзе, Е. Л. Матвеевко, А. О. Ревякин, С. В. Огнев

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Контактная информация: Матвеевко Елена Леонидовна, e-mail: matveyenkoel@mail.ru

На примере НЦБМТ РАМН рассмотрены требования к помещениям для содержания животных и проведения экспериментов на основе требований GLP.

Ключевые слова: качественная лабораторная практика (GLP), здания и сооружения, оборудование, эксперимент.

В мае 2002 г. был организован Научный центр биомедицинских технологий РАМН (Центр) в поселке Светлые горы. Еще в 1930-х годах в поселке существовал совхоз «Светлые горы», который прошел сложный путь от конного завода рысистых лошадей до питомника лабораторных животных, обеспечивающего нужды медицинской науки и здравоохранения. Работа по разведению и поддержанию племенных ядер лабораторных животных не прекращалась даже в годы Великой Отечественной войны. В 1961 г. на базе питомника была организована лаборатория экспериментальных животных, получившая в 1967 г. статус самостоятельного учреждения. Этот год можно считать датой создания первой в СССР самостоятельной специализированной организации, занимающейся лабораторным животноводством.

В настоящее время фонд животных Центра насчитывает более 100 линий и сток

мышей и крыс, которые внесены в международный каталог, популяции морских свинок, сирийских хомячков, кроликов, миниатюрных свиней. Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев). С филиалами сотрудничают более 100 потребителей лабораторных животных из России и стран СНГ. Основными потребителями являются научно-исследовательские учреждения РАМН, РАН, Минздравсоцразвития, Министерства обороны РФ, учебные заведения медико-биологического и сельскохозяйственного профиля.

Для соблюдения требований, предъявляемых к качеству животных, и обеспечения условий повторяемости результатов экспериментов, проводимых на них, всех животных необходимо выращивать с учетом фундаментальных основ GLP.

В частности, в Руководстве по GLP, подготовленном Всемирной организацией здравоохранения в 2000 г., указаны требования, предъявляемые к зданиям и сооружениям, в которых содержат животных.

Из фундаментальных основ GLP

ПОМЕЩЕНИЯ ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ ЖИВОТНЫХ

Помещения для животных должны быть спроектированы таким образом, чтобы минимизировать воздействие внешних условий на животных, ограничить их контакт друг с другом и предотвратить распространение болезнетворных организмов.

Требования к помещениям различаются в зависимости от характера и длительности исследования. Риски контаминации могут быть снижены использованием системы барьеров, через которую должны проходить научный и обслуживающий персонал, корма и расходные материалы, предназначенные для локального использования.

Стандартный корпус для содержания лабораторных животных должен иметь отдельные зоны для:

- содержания животных;
- проведения экспериментов;
- карантина (карантинный бокс);
- раздевалок;
- получения материалов;
- хранения: 1 – подстилки и кормов, 2 – тестов, 3 – клеток;
- приспособлений для мытья оборудования;
- некропсии;
- проведения лабораторных процедур;
- подсобных помещений (мочные, туалеты и т.п.);
- утилизации отходов.

Здание и комнаты должны иметь достаточные площади для размещения в них животных и нормальной экспериментальной работы.

В помещениях должен проводиться постоянный контроль за температурой, влажностью, движением воздуха и освещенно-

стью. Данные показатели нормируются для каждого вида животных.

Поверхность стен, пола и потолка должна быть гладкой и удобной для мытья, без выступов и шероховатостей, в которых могут скапливаться грязь, вода и пыль.

Помимо внутренних условий необходимо добиться снижения потенциальной опасности влияния внешних воздействий. Этого можно достичь путем:

- сокращения численности персонала, имеющего доступ в данное здание;
- ограничения доступа входа к животным;
- организации работ таким образом, чтобы перемещение чистых и грязных материалов проводилось в разное время, с последующим мытьем коридоров, если конструкция здания не позволяет разделить их в пространстве;
- требований к персоналу выполнять различные операции в разной одежде;
- санитарной обработки помещений между экспериментами.

В Центре проводится постоянная работа по обеспечению выполнения этих требований. Существует система автономного снабжения водой и электроэнергией. С 2002 г. капитально отремонтированы и реконструированы ряд зданий и сооружений Центра. Вводятся в строй модули лабораторных животных. Все корпуса снабжены системой пожарной сигнализации и средствами пожаротушения. Территория ограждена капитальным забором протяженностью 1228 м, заменено 4270 м инженерных сетей, около 3000 м сетей и систем энергообеспечения, реконструировано 8 зданий общей площадью 3024 м², благоустроено 2260 м² территории. В перспективе дальнейшего развития запланирована реконструкция 5 зданий площадью более 2000 м², благоустройство около 3000 м² территории.

Каждый вид животных содержат в отдельном корпусе. Доступ в корпус для разведения и содержания племенных

ядер мышей ограничен. Уборка помещений проводится регулярно. Отходы утилизируются в соответствии с санитарно-гигиеническими требованиями.

На рис. 1 дан общий вид модуля для содержания племенных ядер мышей. Модуль оснащен приточно-вытяжной вентиляцией и дополнительной системой кондиционирования (рис. 1, 2). Освещение помещения и сами стеллажи для размещения клеток с животными организованы таким образом, чтобы клетки освещались равномерно, независимо от их размещения на стеллаже (рис. 3). Каждая клетка снабжена специальной табличкой, содержащей всю информацию о находящихся в ней животных. Освещение, вентиляция и кондиционирование воздуха (температура, влажность) регулируются автоматически. Модуль разде-



Рис. 1. Общий вид модуля для содержания коллекционного фонда мышей



Рис. 2. Оборудование для приточно-вытяжной вентиляции модулей

лен на зоны, которые включают зону для сотрудников (кабинеты сотрудников, бытовая комната, раздевалки, туалет, душ), «чистую» зону (помещения для содержания животных, карантин) и «грязную» зону (моечная, склад кормов, подстилки, клетки, подсобные помещения). Общий вид коридора в модуле для содержания мышей показан на рис. 4. Предварительная обработка клеток для содержания животных проводится в специальном помещении (рис. 5).

Из фундаментальных основ GLP ПОМЕЩЕНИЯ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Помещения для экспериментов должны иметь подходящие для проведения экспериментальной работы проектировку, размеры и дизайн, чтобы возможные ошибки при проведении эксперимента были минимальны.

Данное требование направлено на достижение того, чтобы данные эксперимента будут достоверны. Это касается не только строительства соответствующих корпусов, но в большей мере предполагает тщательное планирование эксперимента.

Сведение к минимуму ошибок при проведении эксперимента может быть сделано за счет разделения различных аспектов исследования следующим образом.

– *Физическое разделение*, например разделение стенами, дверями или фильтрами при строительстве или реконструкции зданий, физическое разделение помещений может быть частью проекта. С другой стороны, разделения можно достичь, например, за счет использования изоляторов.

– *Организационное разделение*, например выполнение различных видов деятельности в одном и том же помещении, но в разное время с последующей уборкой и подготовкой следующих операций специальным персоналом, или за счет выделения специальных рабочих зон внутри лаборатории (вытяжные шкафы, ламинарные боксы).

Проиллюстрировать перечисленные принципы можно следующим образом.



Рис. 3. Стеллажи с клетками для содержания: 1 – мышей, 2 – крыс



Рис. 4. Общий вид коридора модуля



Рис. 5. Помещение и оборудование для мытья клеток

В Центре в лабораторных корпусах выделены отдельные зоны для выполнения различных операций. На рис. 6 показан общий вид лабораторного корпуса. Лабораторные корпуса оснащены не только системой приточно-вытяжной вентиляции, но и бактерицидными ультрафиолетовыми облучателями. Планируется приобрести портативные озонаторы для лабораторий, которые позволяют проводить качественную и быструю дезинфекцию помещений. За последние годы приобре-

тены и введены в строй оборудование и аппаратура для научно-исследовательских и вспомогательных работ, позволяющие проводить НИОКР на современном уровне и в соответствии с требованиями GLP (рис. 7–10). Эксперименты на животных проводятся под контролем ветеринарного врача, также создана специальная группа сотрудников, которая следит за биоэтикой экспериментальной работы. В лабораторных корпусах имеются специальные вива-

рии для содержания животных, участвующих в эксперименте (рис. 11).

Мониторинг здоровья животных проводит специально созданная лаборатория (рис. 12). В корпусе имеется виварий, в котором содержатся контрольные животные для проведения различных тестов, показывающих состояние здоровья животных коллекционного фонда. В этом же корпусе расположена лаборатория клеточных технологий (рис. 13).

В Центре имеется отдельный экспериментальный корпус с виварием, в котором содержат мини-свиней светлогорской популяции и проводят экспериментальную работу.

В помещениях для содержания мини-свиней имеется система вентиляции, гидросмыва, освещения и отопления с возможностью регулировки. Карантинное помещение имеет отдельный вход. Все боксы имеют таблички с информацией из племенной карточки животных. Родильное отделение с четырьмя боксами отгорожено от общего помещения (рис. 14). Кормокухня и склад кормов расположены в специально оборудованных помещениях. За корпусом находятся специальные отстойники, в которые попадают отходы после уборки помещений (гидросмыв). Вывоз отходов производится регулярно специальной техникой.

Корпус также имеет помещения для сотрудников (бытовые комнаты, раздевалки, туалеты, душевые). Специально оборудована зона для проведения экспериментальной работы (рис. 15).

Лаборатория гнотобиологии оборудована специальными боксами. Вход в лабораторию ограничен и осуществляется через специальные барьеры (рис. 16). Полученных гнотобиотических животных (мыши, крысы) помещают в специальные клетки, имеющие систему для подачи стерильных кормов и воды и снабженные системой автономного обеспечения

воздухом. В таких клетках животные могут транспортироваться в другие корпуса для проведения исследований, а также в другие города (клетки поддерживают SPF-статус животных до 4 часов без подключения к системе).

Из фундаментальных основ GLP

ПОМЕЩЕНИЯ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ И ВЫДАЧИ ЛЕКАРСТВ

Помещения для хранения и выдачи лекарств являются лабораторией, в которой работы проводятся в следующем порядке: прием – хранение – распределение – взвешивание – смешивание – доставка в помещения с животными – утилизация отходов.



Рис. 6. Общий вид лабораторного корпуса



Рис. 7. Общий вид «чистого коридора» лабораторного корпуса



Рис. 8. Оборудование для проведения гематологических и биохимических анализов

Рис. 9. Помещение для проведения электроэнцефалографии головного мозга и снятия ЭКГ

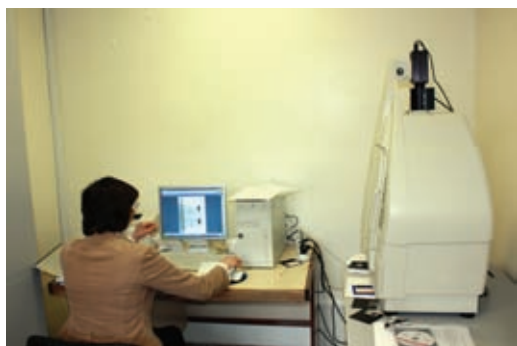


Рис. 10. Лаборатория ПЦР-диагностики

Размеры помещений

Лаборатория должна быть достаточной по площади для размещения в ней персонала и выполнения им работ без риска помешать друг другу или нарушить условия приготовления смеси.

Каждый сотрудник должен иметь подходящее по размерам рабочее место для правильного выполнения операций. Кроме того, должно быть предусмотрено достаточное физическое разделение рабочих мест для снижения возможности случайного смешения



Рис. 11. Виварий лабораторного корпуса



Рис. 12. Лаборатория мониторинга здоровья животных



Рис. 13. Оборудование лабораторий гистологии, морфологии



Рис. 14. Общий вид помещения для содержания мини-свиней светлогорской популяции

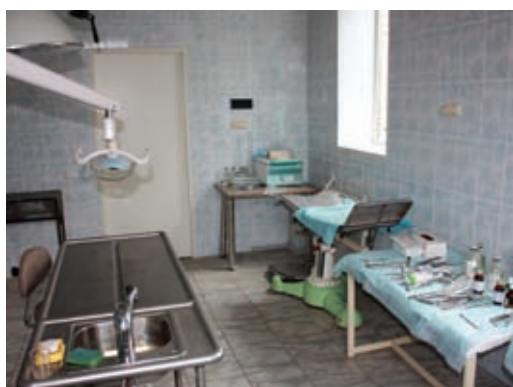


Рис. 15. Операционная



Рис. 16. Лаборатория гнотобиологии

приготавливаемых смесей или перекрестной контаминации.

Конструкционные особенности

Лаборатория должна быть построена из материалов, которые легко моются и не дают возможности аккумуляции тестовых материалов и перекрестной контаминации с другими материалами. Должна быть вентиляция, обеспечивающая движение воздуха от оператора через фильтры, которые защищают персонал и предотвращают перекрестную контаминацию. Большая часть современных смешанных помещений для выдачи лекарств в настоящее время проектируется как система боксов, каждый из которых имеет свою независимую систему кондиционирования воздуха.

Устройство помещений

Помещение должно иметь отдельные зоны для:

- хранения тестов в различных условиях;
- хранения контрольных материалов;
- работы с летучими веществами;
- взвешивания;
- смешивания различных комбинаций веществ, например в кормах или суспензии;
- хранения приготовленных смесей;
- приспособлений для уборки;
- офисов и для отдыха;
- раздевалок.

В НЦБМТ РАМН все лекарственные средства: ветеринарные препараты и вакцины, лекарственные вещества, предназначенные для доклинических и других исследований, хранятся в индивидуальных фармацевтических боксах и холодильниках, которые имеют систему защиты от свободного доступа.

Подготовка и хранение лекарственных средств производится в специально отведенной и оборудованной комнате, соответствующей нормативам, предъявляемым к фармацевтическим помещениям.

Оборудование

В наличии должно быть подходящее оборудование, соответствующее поставленным целям исследования. Все оборудование должно быть правильным образом откалибровано и позволять точно провести все исследования. Должны иметься записи всех проведенных ремонтов, стандартных и нестандартных настроек оборудования.

Данное требование GLP связано с тем, что полученные в результате эксперимента данные должны быть достоверны и не должны содержать ошибок, связанных с неправильно работающим или неисправным оборудованием.

Соответствие оборудования целям эксперимента

Оборудование, используемое в эксперименте, должно соответствовать поставленным целям. В частности, нет необходимости взвешивать до десятых долей миллиграмма вес крыс, чтобы измерить их еженедельный привес, такая точность измерений необходима для аналитической лаборатории. Адекватность измерений касается и частоты их проведения.

Калибровка оборудования

Периодически должна проводиться проверка оборудования на соответствие его стандартам. Проверки проводятся как для измерительного оборудования (например, аналитические или обычные весы), так и для оборудования, обеспечивающего условия работы и содержания животных (кондиционеры, холодильники и т.п.).

Для калибровки измерительного оборудования необходимо использовать существующие стандарты, например стандарты веса для весов. Для аналитического оборудования используют образцы с известной концентрацией веществ, для того, чтобы можно было достоверно убедиться в правильности получаемых результатов и расчетов, выполненных на их основе. Другие виды оборудования, такие как системы кондиционирования или поддержания температурного режима в помещениях для содержания животных, проверяют периодически, чтобы избежать нежелательных эффектов от неисправного оборудования.

Поддержка и техническое обслуживание оборудования

Требования GLP к поддержке и техническому обслуживанию оборудования заключаются в том, что спецификации оборудования должны соответствовать целям и задачам эксперимента, а техническое обслуживание оборудования должно сводить к минимуму возможность поломки и потерю данных во время эксперимента.

Техническое обслуживание оборудования проводится двумя различными способами.

– Плановое обслуживание, когда проводится проверка независимо от наличия поломок оборудования, и ремонт, в ситуациях, когда калибровка или проверка показали, что работа оборудования не соответствует описанию. Плановое обслуживание рекомендуется проводить для крупногабаритного оборудования или для оборудования, не полностью соответствующего требованиям или являющегося альтернативным. Плановое обслуживание снижает риск поломок.

– Для компьютеров, электронных анализаторов или весов, проверка которых обычными способами затруднена, оптимальным вариантом является регулярное обслуживание и определение соответствия требованиям эксперимента в случаях необходимости. Эти виды оборудования могут иметь дублирующие экземпляры или должны ремонтироваться в случае поломки немедленно службой технической поддержки.

Для жизненно важного оборудования необходимо предусмотреть систему поддержки, в частности от скачков напряжения в электрической сети. Лаборатория должна иметь систему оповещения о возможных сбоях в работе для поддержки жизнеобеспечения животных и сохранения полученных данных. Лаборатория, проводящая эксперименты на животных, должна как минимум иметь автономную систему питания, так как потери животных или потери данных в эксперименте могут быть невозможными.

Поэтому требования регулярной проверки оборудования должны соблюдаться неукоснительно. Система оповещения может помочь в решении этой проблемы, так как основная масса поломок, как правило, происходит в момент, когда персонал лаборатории отсутствует.

В лабораториях Центра установлено новое современное оборудование, соответствующее международным требованиям, которое постоянно проходит все необходимое обслуживание, техническую поддержку и калибровку. Ремонт производится в

сервисных центрах производителей оборудования.

Список литературы

Good laboratory practice (GLP). Quality practices for regulated non-clinical research and development. Handbook. Geneva, 2000.

Good laboratory practice (GLP): buildings of Scientific Center of Biomedical Technologies RAMS

G. D. Kapanadze, E. L. Matveenko, A. O. Revyakin, S. V. Ognev

The GLP requirements for buildings which should be adequacy to be sufficient for animals and studies described with illustration from real practice in Scientific Center of Biomedical Technologies RAMS and it's branches «Andreevka» and «Stolbovaya».

Key words: good laboratory practice (GLP), buildings, equipment, studies.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

Журнал «Биомедицина» публикует статьи обзорного, экспериментального и учебно-методического плана, не публиковавшиеся ранее в других изданиях. В приоритетном порядке печатаются статьи, посвящённые биологическому, математическому и комплексному моделированию. Принимаются рукописи, касающиеся доклинических и клинических испытаний лекарственных препаратов; выполненных на классических и альтернативных биологических объектах. Особое внимание уделяется вопросам генетической, микробиологической, экологической стандартизации лабораторных животных в соответствии с рекомендациями GLP и российскими нормативами. Публикуются работы по внедрению в лабораторную практику новых видов, представляющих ценность для биомедицинских исследований в качестве тест-систем, биологических объектов, моделирующих патологические состояния человека, продуцентов вакцин и сывороток клеточных культур, органов и тканей для ксенотрансплантации. Рассматриваются проблемы обеспечения репрезентативности, воспроизводимости и экстраполяции на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных. Значительное место отводится статьям по разработке и внедрению новых биомедицинских технологий.

Рубрикация журнала

1.Обзоры

2.Оригинальные статьи

3.Краткие сообщения

4.Практикум

5.Нормативные документы

В рубрике «Обзоры» публикуются обзоры научной литературы, по темам, соответствующим профилю журнала, методологические статьи (максимальный объём рукописи — до 12 стр., максимальное количество ссылок — до 35).

В рубрике «Оригинальные статьи» печатаются труды, отражающие результаты завершённых исследований (до 10 стр., до 25 ссылок).

В «Кратких сообщениях» приводятся завершённые фрагменты работ, представляющие самостоятельный интерес (до 4 стр., до 15 ссылок).

«Практикум» – учебно-методический раздел, где помещаются описания используемых в биомедицине методик, новых технологий (до 6 стр., до 10 ссылок).

В разделе «Нормативные документы» печатаются правила обращения с лабораторными животными, отечественные и международные законодательные акты, регламентирующие использование биомоделей в экспериментах (до 3 стр.).

Общие требования к оформлению

Статью следует представлять в двух экземплярах с электронной версией текста, набранном в программе Microsoft Word шрифтом Times New Roman, кегль 12 на одной стороне листа с интервалом 1 между строками и полями 2,5 см со всех сторон. Латинские названия видов должны быть выделены курсивом.

На первой странице следует указать: 1) предполагаемую рубрику журнала, 2) название статьи, 3) инициалы и фамилии авторов, 4) учреждения, в которых была проведена работа, город или населённый пункт. На той же странице печатается реферат (не более 250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов). В конце статьи приводится список цитированной литературы (см. «Литература») и ставятся собственноручные подписи всех авторов рукописи. Нумерация страниц – сверху по центру (на первой странице её номер не проставляется).

На отдельных листах печатаются таблицы, иллюстративный материал, подписи к рисункам, а также — реферат и ключевые слова на английском языке. К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу и на отдельном листе – фамилию,

имя, отчество автора, осуществляющего связь с редакцией, его почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты.

Статьи, написанные по результатам экспериментальных исследований, должны (если это возможно) строиться по схеме: «Введение», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Литература». Для работ, предназначенных для рубрики «Краткие сообщения» раздел «Обсуждение результатов» необязателен, а количество литературных ссылок должно быть минимальным. Форма изложения обзорных и теоретических статей – свободная.

Статьи, описывающие исследования, выполненные на экспериментальных животных или альтернативных биологических объектах, в разделе «Материалы и методы» должны содержать следующую информацию: организм, орган, ткань, клеточная культура, микробная культура, субклеточный, молекулярный уровень экспериментальных объектов. В тех работах, где были использованы лабораторные животные, следует указать: 1 – биологический вид; 2 – пол; 3 – возраст или массу животного; 4 – генетический статус: инбредные линии, популяции нелинейных животных гибриды, генетически модифицированные организмы (трансгенные, нокаутные); 5 – источник, откуда получены животные; 6 – микробиологический статус: гнотобиоты; SPF; конвенциональные; 7 – условия содержания: виварий, изолятор, барьерная система, тип клеток, плотность посадки животных, корм.

Статистическая обработка результатов и таблицы

Таблицы должны содержать только обобщённые и статистически обработанные материалы исследования. Следует указать метод обработки результатов и необходимые для расчётов исходные данные. Информация, представленная в таблицах, не должна повторяться в тексте статьи. Таблицы должны быть пронумерованы и озаглавлены. Они печатаются на отдельных листах, а в тексте в круглых скобках дается ссылка на них, например: (см. табл. 1).

Иллюстративный материал

Рисунки не должны дублировать материалы таблиц. Все обозначения на них необходимо сопровождать пояснениями в подписи к рисунку. Иллюстрации следует пронумеровать в порядке их упоминания в тексте. На обороте каждого рисунка или фотографии должны быть указаны (карандашом) фамилии авторов, название статьи, номер рисунка, «верх». Подписи к рисункам даются общим списком на отдельной странице. Для микрофотографий полагается указать способ фиксации образцов и увеличение. На полях рукописи следует проставить (карандашом) номера таблиц и рисунков напротив тех мест в тексте, где желательно их поместить. Требования к иллюстрациям на дискетах или компакт-дисках: а) чёрно-белая графика – разрешение: не менее 600 точек на дюйм, формат: EPS или TIF, б) полутоновые и цветные изображения – разрешение не менее 300 точек на дюйм, формат EPS или TIF, в) диаграммы и графики (векторные изображения) представляются в собственном формате программы Adobe Illustrator, FreeHand или CorelDraw или в формате EPS с приложением исходных (табличных) данных, по которым построены графики/диаграммы.

Сокращения

Помимо общепринятых, допускается использование не более 3 сокращений терминов, с обязательным указанием полного названия (в скобках) при первом упоминании в тексте.

Литература

Цитируемая в статье литература приводится общим списком в конце статьи в порядке цитирования. Ссылки на цитируемую литературу в тексте статьи отмечаются порядковым номером работы в списке литературы, заключённым в квадратные скобки. Фамилии иностранных авторов указываются (если это необходимо) в тексте на русском языке, при первом упоминании приводится их написание на языке оригинала в круглых скобках.

В списки литературы приводятся

Для книг: фамилии и инициалы всех авторов, название, место издания, название издательства, год издания, цитируемые страницы, либо общее количество страниц в книге (если текст статьи содержит несколько ссылок на данную книгу).

Пример:

1. *Даренская Н. Г., Ушаков И. Б., Иванов И. В.* Экстраполяция экспериментальных данных на человека в физиологии и радиологии. М.—Воронеж: ИСТОКИ, 2004. 232 с.,

для главы (статьи) в книге: фамилии и инициалы авторов главы, название главы, название книги, фамилии и инициалы редакторов, место издания, название издательства, год издания, первая и последняя страницы главы.

Пример:

2. *Авербах М. М., Мороз А. М.* Естественная резистентность к туберкулезу и некоторые вопросы иммуногенетики. // В кн.: Иммунология и иммунопатология туберкулеза. М.: Медицина, 1976. С. 106—116,

для статьи в журнале: фамилии и инициалы авторов, название статьи, наименование журнала, год, том (выпуск), номер, первая и последняя страницы статьи.

Пример:

3. Каркищенко Н. Н. Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины // Биомедицина. 2005. № 1. С. 5—17.

для сайта: ссылка на страницу в Интернете.

Пример:

<http://www.nih.gov/science/models/mouse/knockout/index.html>

Корректурa

Рукописи, не отвечающие перечисленным правилам, не рассматриваются и не возвращаются. Редакция оставляет за собой право принимать решение о публикации рукописи, производить редакционные изменения и сокращения, стилистическую правку, а также переносить статью в другую рубрику или номер журнала. Все рукописи направляются на внешнее рецензирование. За публикацию статей плата не взимается и гонорар не выплачивается.

После опубликования статьи авторам высылается бесплатно 1 экземпляр журнала.

Рукописи направлять по адресу:

143332 Московская обл., Красногорский р-н, п/о Отрадное, пос. Светлые Горы, ГУ НЦБМТ РАМН, редакция журнала «Биомедицина».

Электронный адрес ГУ НЦБМТ РАМН: matveyenkoel@mail.ru

Телефон редакции: 561-52-64.