

Научный журнал.

Основан в 2005 году Научным центром биомедицинских технологий РАМН

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

Подписной индекс 57995 в Каталоге «Издание 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. Капанадзе (к.с.-х.н., зам. главного редактора),
В. Н. Каркищенко (д.м.н., проф., зам. главного редактора),
Л. Х. Казакова (к.б.н.), Ю. С. Макляков (д.м.н., проф.), Е. Л. Матвеев (к.э.н., доц.),
А. Н. Мурашев (д.б.н., проф.), Г. В. Раменская (д.ф.н., проф.), А. О. Ревякин (к.б.н.),
И. В. Сарвилина (д.м.н.), Н. В. Станкова (к.б.н., ответственный секретарь),
Д. А. Сычев (д.м.н., проф.), Д. Б. Чайванов (к.ф.-м.н.), Е. В. Ших (д.м.н., проф.)

Редакционный совет:

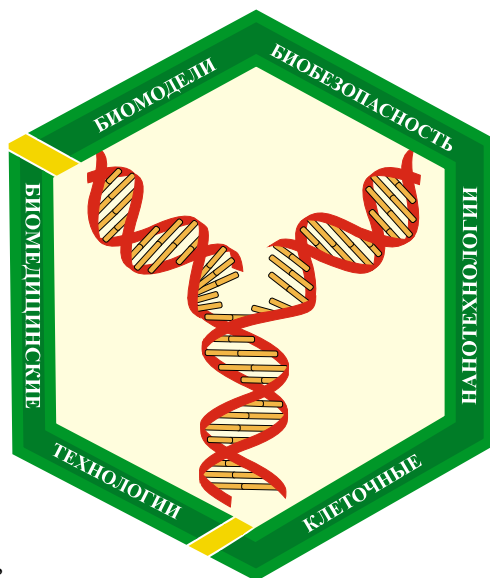
член-корр. РАН и РАМН К. В. Анохин, проф. Е. Е. Ачкасов, prof. Iorgen Backmen (Германия),
акад. РАМН и РАСХН В. А. Быков, проф. Витан Влахов (Болгария), акад. РАМН А. М. Дыгай,
prof. Moineao S.-F. D'Herelle (Канада), акад. РАМН С. И. Колесников, акад. РАМН А. А. Кубатиев,
акад. РАМН В. Г. Кукес, акад. РАН А. И. Мирошников, проф. С. П. Нечипоренко,
акад. РАН и РАМН М. А. Пальцев, акад. РАМН В. И. Петров, акад. РАМН К. В. Судаков,
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
scbmt@mail.ru www.scbmt.ru
Тел.: 8 (495) 561-52-64

Отпечатано в типографии «Лин-Интер»
127591, Москва, ул. Дубнинская, д. 83а
Подписано в печать 07.03.2012 г.
Тираж 3 000 экз.



Содержание

НОВЫЕ БИМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Н.Н. Каркищенко, Д.Б. Чайванов, А.А. Вартанов Выбор оптимальной технологии локализации транскраниальных нейростимуляторов на скальпе человека	6
---	---

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

Д.П. Хлопонин, Ю.С. Макляков, Ю.Н. Кротова, В.Н. Каркищенко Обмен полиаминов в миокарде при моделировании регенераторно-пластической сердечной недостаточности у крыс	10
С.В. Чепур, В.Н. Быков, М.А. Юдин, А.С. Никифоров, И.В. Фатеев, А.А. Арутюнян Особенности экспериментального моделирования соматических и неврологических заболеваний для оценки эффективности лекарственных препаратов	16

МЕТОДЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Д.А. Беляев, М.М. Пекелис, Ю.В. Фокин, Л.Х. Казакова Анализ некоторых физиологических и этиологических характеристик бесшерстных крыс как новая модель биомедицинских исследований	29
Н.Ю. Игнатьева, О.Л. Захаркина, М.В. Кочуева, А.В. Масленникова, В.А. Каменский, В.Н. Баграташвили Радиационно-индуцированные повреждения коллагена в сухожилиях in vitro	37
Я.М. Чаленко, В.В. Шумянцева, С.А. Ермолаева, А.И. Арчаков Исследование антибиотикорезистентности микроорганизмов электрохимическими методами	43

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Н.В. Станкова, Г.Д. Капаназе Селекционно-генетическая и экспериментальная работа с мини-свиньями светлогорской популяции	49
--	----

ГЕНЕТИКА

Т.Б. Бескова, Н.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов, О.И. Степанова, Е.Л. Матвеев Возврат ранее утерянного гена misty в генотип мышей C57BL/Ks-Leprdb/+	54
---	----

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Е.В. Ганцгорн, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин, А.Е. Матухно, О.М. Куделина, Н.Н. Каркищенко Церебропротекторные эффекты пирасетама и его комбинации с мелаксеном при глобальной ишемии головного мозга у крыс	60
А.К. Гусейнов, В.Н. Каркищенко, А.В. Сергиенко, М.Н. Ивашев Изучение острой токсичности и раздражающего действия лецитина	67
Е.А. Иванова, А.В. Непоклонов, И.И. Кокшенев, И.Г. Капица, Т.А. Воронина, Е.А. Вальдман Изучение антикаталептической активности гимантана при различных путях введения и в комбинации с леводопой	74

Е.К. Кречина, Л.Н. Герчиков, А.С. Григорьян, В.В. Наумова, Л.М. Демина Об исследовании специфической активности, местнораздражающего действия, острой и хронической токсичности геля Ревесал	82
Ю.Н. Кротова, Д.П. Хлопонин, П.А. Хлопонин, Т.В. Архипова Анализ кардиопротекторного влияния небиволола на ультраструктуру миокарда при регенераторно-пластической сердечной недостаточности у крыс	86
О.М. Куделина, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин, А.Е. Матухно, Е.В. Ганцгорн Анализ ЭЭГ крыс при введении флуоксетина и его комбинации с мелатонином	93
Е.А. Туховская, А.В. Лобанов, А.Н. Мурашев Изучение влияния нового синтетического пептида – производного аполипопротеина E COG1410 на поведение и морфологию головного мозга крыс CD после перенесенного фокального инсульта	99
Э.Р. Шайхутдинова, И.А. Боброва, О.Н. Хохлова, Г.А. Слащева, А.Н. Мурашев Фармакологические подходы к повышению устойчивости миокарда на модели острого инфаркта у крыс CD	102

ПРАКТИКУМ

Н.В. Касинская, С.Е. Деньгина, О.И. Степанова, Ю.В. Фокин Подбор индивидуального праймера и оптимизация условий проведения полимеразной цепной реакции для обнаружения гена GFP (green fluorescent protein)	106
Р. В. Мартиросян, А.Б. Шехтер, В.Н. Балин, Г.Д. Капаназе, Л.В. Винокурова Сравнительное изучение в эксперименте эффективности применения наноструктурированных, минеральных и природных компонентов при костных дефектах	112
В.В. Удуг, А.И. Венгеровский, Д.А. Коршунов, Н.Н. Каркищенко Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на биоэнергетику и перекисное окисление липидов печени при экспериментальной патологии, вызванной парацетамолом	120

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

А.О. Ревякин, Е.Л. Матвеев, Г.Д. Капаназе Надлежащая лабораторная практика (GLP): персонал и управление экспериментальной работой в Научном центре биомедицинских технологий РАМН	128
---	-----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

А.Ю. Зурабов, Н.Н. Каркищенко, Д.В. Попов, Е.Л. Жиленков, В.М. Попова Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов	134
Д.Г. Ковалев, Н.А. Мохаммад Амин Токсикологический профиль новых противовирусных производных аденина	139
Н.С. Пономарь, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин, А.О. Ревякин Влияние препарата ионизированного серебра на репаративную регенерацию кожи и подлежащих тканей при моделировании термических и химических ожогов у крыс	143

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

- N.N. Karkischenko, D.B. Chayvanov, A.A. Vartanov**
Choice of optimum technology of localisation transcranial neurostimulators on a human scalp 6

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

- D.P. Khloponin, Yu.S. Maklyakov, Yu.N. Krotova, V.N. Karkischenko**
Nebivolol influence on myocardial polyamines metabolism
in a rat model of regenerative & plastic heart failure 10
- S.V. Chepur, V.N. Bykov, M.A. Udin, A.S. Nikiforov, I.V. Fateyev, A.A. Arutyunyan**
Features of experimental modeling of somatic and neurologic
diseases for estimation of medical products efficiency 16

BIOMEDICAL METHODS

- D.A. Belyaev, M.M. Pekelis, Yu.V. Fokin, L.Kh. Kazakova**
The analysis of some physiological and ethological characteristics
of hairless rats as new model of biomedical researches 29
- N.Yu. Ignatieva, O.L. Zakharkina, M.V. Kochueva, A.V. Maslennikova,
V.A. Kamensky, V.N. Bagratashvili**
The effects of gamma irradiation on the collagen in rat tail tendon *in vitro* 37
- Ya.M. Chalenko, V.V. Shumyanceva, S.A. Ermolaeva, A.I. Arhcaikov**
Investigation of antibiotic resistance of microorganisms the usage of electrochemical methods..... 43

LABORATORY ANIMALS

- N.V. Stankova, G.D. Kapanadze**
Selection, genetic and experimental work with minipigs of Svetlogorsk population..... 49

GENETICS

- T.B. Beskova, N.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, O.I. Stepanova, E.L. Matveenko**
Renewal of lost gene misty in genotype C57BL/Ks-Leprdb/+ mice..... 54

NONCLINICAL TESTS

- E.V. Ganzgorn, Yu.S. Maklyakov, D.P. Khloponin, A.E. Matukhno, O.M. Kudelina,
N.N. Karkischenko**
Piracetam & piracetam combination with melaxen cerebroprotective
effects at global cerebral ischemia in rats 60
- A.K. Gusejnov, V.N. Karkishchenko, A.V. Sergienko, M.N. Ivashev**
Studying of sharp toxicity and irritating action of lecithin..... 67
- E.A. Ivanova, A.V. Nepoklonov, I.I. Kokshenev, I.G. Kapitsa, T.A. Voronina, E.A. Valdman**
Study of anticataleptic activity of hemantane using different routs
of drug administration and in combination with levodopa 74

- E. K. Krechina, L.N. Gerchikov, A.S. Grigorian, V.V. Naumov, L.M. Demina**
About of the study specific activity, local irritating action, acute and chronic toxicity of the gel Revesal 82
- Yu.N. Krotova, D.P. Khloponin, P.A. Khloponin, T.V. Archipova**
Analysis of nebivolol cardioprotective effect on myocardium ultrastructure
during regenerative & plastic heart failure in rats..... 86
- O.M. Kudelina, Yu.S. Maklyakov, D.P. Khloponin, A.E. Matukhno, E.V. Ganzgorn**
EEG-analysis of the rats during fluoxetine & fluoxetine with melatonine combination 93
- E.A. Tukhovskaya, A.V. Lobanov, A.N. Murashev**
Investigation of the effects of new synthetic peptide – derivative of ApoE COG1410
on the behavior and brain morphology of CD rats subjected to focal stroke 99
- E.R. Shayhutdinova, I.A. Bobrova, O.N. Hohlova, G.A. Slasheva, A.N. Murashev**
Pharmacological approaches to increase of stability of a myocardium
on model of a sharp heart attack at CD rats 102

PRACTICE

- N.V. Kasinskaya, S.E. Dengina, O. I. Stepanova, Yu.V. Fokin**
Selection of individual primer and optimization of conditions of carrying out
chain reaction for gene GFP(green fluorescent protein) detection 106
- R.V. Martirosyan, A.B. Shehter, V.N. Balin, G.D. Kapanadze, L.V. Vinokurova**
Experimental modeling with the aim of histology studying of bone defects of alveolar arches
of rabbits in dynamics by filling them with osteoplastic materials..... 112
- V.V. Udut, A.I. Vengerovsky, D.A. Korshunov, N.N. Karkischenko**
Influence of hepatoprotective agents of phospholipids' structure on liver bioenergetics
and lipoperoxidation in experimental liver pathology caused by paracetamol 120

NORMATIVE DOCUMENTS

- A.O. Revyakin, E.L. Matveenko, G.D. Kapanadze**
Good laboratory practice (GLP): personnel and management in experimental
studies in Scientific Center of biomedical technologies under the RAMS..... 128

BRIEF REPORTS

- A.Yu. Zurabov, N.N. Karkischenko, D.V. Popov, E.L. Zhilenkov, V.M. Popova**
Creation of native bacteriophages collection and principle
of treatment and profilactic phages drug design 134
- D.G. Kovalev, N.A. Mohammad Amin**
Neurotoxic profile of the new adenine derivative with antiviral activity..... 139
- N.S. Ponomar, Yu.S. Maklyakov, D.P. Khloponin, A.O. Revyakin**
Ionized silver medicinal preparation influence on reparative regeneration of the skin
& underlying tissues in the model of thermal & chemical burns in rats 143

Выбор оптимальной технологии локализации транскраниальных нейростимуляторов на скальпе человека

Н.Н. Каркищенко¹, Д.Б. Чайванов², А.А. Варганов²

¹ – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Контактная информация: к.ф.-м.н. Дмитрий Борисович Чайванов chaivanov@yandex.ru

Для проведения транскраниальной нейростимуляции необходима методика правильного расположения стимуляторов над заданными структурами мозга. В работе рассмотрены транскраниальная магнитная стимуляция, ритмическая электростимуляция, транскраниальная микрополяризация; определены требования по точности установки стимуляторов и найдены оптимальные технологии локализации.

Ключевые слова: транскраниальная магнитная стимуляция, транскраниальная электростимуляция, ритмическая электростимуляция, транскраниальная микрополяризация, УЗ-стимуляция, нейромодуляция, локализация.

Цель: Для проведения транскраниальной нейростимуляции необходима методика правильного расположения стимуляторов над заданными структурами мозга. В работе определены требования по точности установки стимуляторов и найдены оптимальные технологии локализации.

Задача локализации транскраниальных нейростимуляторов на скальпе человека состоит из двух частей: во-первых, определение точности установки стимуляторов и, во-вторых, разработка методики установки стимуляторов с заданной точностью.

Методика транскраниальной нейромодуляции сочетает различные физические методы воздействия на мозг

человека. Каждый из них имеет свои предельно достижимые размеры локализации. Именно величина предельно достижимых размеров локализации определяет требования, предъявляемые к точности установки стимуляторов на поверхности скальпа человека.

Из соображений безопасности все виды стимуляции можно разделить (рис. 1) на допустимые, сомнительные и недопустимые виды [10].

Из рис.1 видно, что наиболее безопасными являются следующие методы: транскраниальная магнитная стимуляция; ритмическая электрическая стимуляция; транскраниальная микрополяризация; ультразвуковая транскраниальная стимуляция.

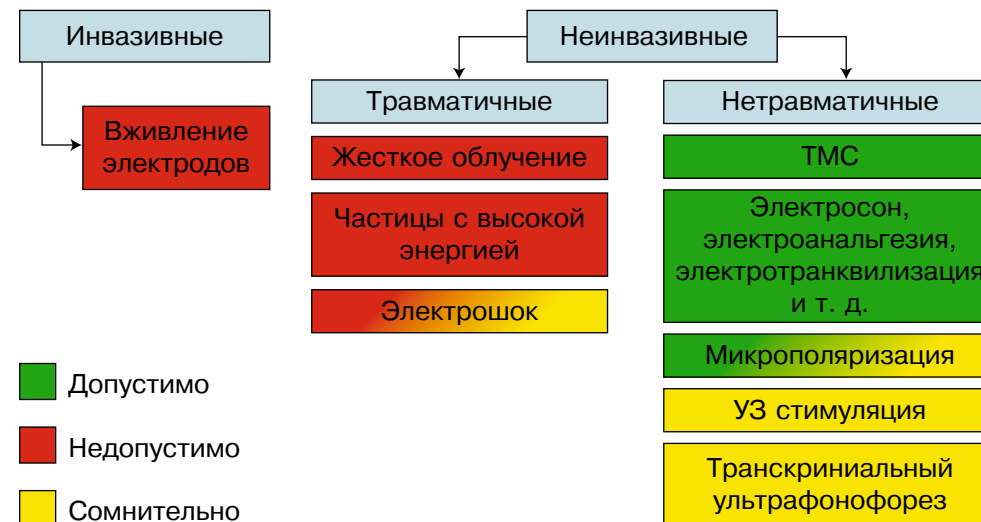


Рис. 1. Допустимость применения различных физических методов воздействия на головной мозг человека

При **транскраниальной магнитной стимуляции (ТМС)** предельно достижимые размеры зоны стимуляции определяются конструкцией индукторов и свойствами электромагнитного поля [3, 8]. Как правило, они лежат в диапазоне 10-30 мм [3, 8], а допустимая погрешность локализации электрода на поверхности скальпа равна 5-10 мм.

При **ритмической электростимуляции** воздействие осуществляется на ствол головного мозга человека, поэтому к точности установки электродов особых требований не предъявляется. Вполне приемлемой является погрешность в 10-20 мм.

При **транскраниальной микрополяризации** коэффициенты затекания токов в зависимости от размеров стимулирующих электродов можно определить по таблице [11].

Из таблицы видно, что при радиусе менее 10 мм затекание тока в мозг прак-

тически не происходит. Следовательно, применять электроды меньших размеров не имеет смысла, а допустимая погрешность локализации электрода на поверхности скальпа равна 5 мм.

Главное препятствие к проведению ультразвуковой стимуляции представляет отражение, рассеяние и затухание ультразвука при прохождении границ скальпа, черепа и тканей мозга.

В ряде статей приводятся данные о различных достижениях по локализации области воздействия ультразвуком [1, 5, 7, 12]. По крайней мере, большинство авторов сходятся во мнении, что диаметр области в 5-10 мм (в зависимости от частоты ультразвука и места воздействия) вполне достижим, а значит, погрешности при установке ультразвуковых стимуляторов не должны превышать 5 мм.

Из приведенного выше анализа видно, что требования к погрешности при

Коэффициенты затекания для электродов разных размеров

Таблица

Радиус электрода, мм	5	7	9	11	13	15
Коэффициент затекания	0,013	0,022	0,033	0,045	0,059	0,073

установке стимуляторов на поверхности скальпа не превышают 5-10 мм.

Известные способы решения задачи локализации можно разделить на непосредственные и опосредованные. Продуктивность метода всегда складывается из двух показателей: метрической точности и возможности идентификации максимально большого числа структур мозга с помощью этого метода [2].

Непосредственные способы локализации заключаются в проведении интроскопического обследования (МРТ, РКТ) и последующего изготовления МРТ-локализатора или применения радиочастотного зонда для определения положения точки мишени по ее координатам в системе координат томограммы. Непосредственная локализация имеет высокую метрическую точность (1-3 мм) и применяется при стереотаксическом вмешательстве [2]. Такая методика требует дорогостоящего оборудования (МРТ, РКТ, радиочастотный зонд) и имеет избыточную для нужд транскраниальной нейростимуляции точность. Погрешность данного метода ограничивается, главным образом, погрешностями идентификации структур на томограмме с помощью стереотаксического атласа — например, Тайлераха.

Также применяются опосредованные способы решения этой задачи с помощью электроэнцефалографических схем, схемы Кронлейна-Брюсовой [9], сравнения внутримозгового пространства пациента со стереотаксическим атласом. Опосредованная локализация часто применяется в случае, если структуру-мишень не удается идентифицировать на томограмме, полученной в результате интроскопического обследования. Так, например, сопряжена с рядом сложностей идентификация на МР-томограмме полей

Бродмана коры больших полушарий головного мозга человека. Эта работа может быть произведена только вручную, и вследствие этого происходит существенная потеря точности. Поэтому в работе [6] мы предложили именно метод опосредованной локализации полей по Бродману.

Нами была разработана методика локализации полей Бродмана коры головного мозга человека на поверхности скальпа [6] и методика локализации проекций поверхностных структур мозга по атласу Тайлераха [4]. Методика заключается в проекции структур мозга на поверхность скальпа и, затем, перевода полученных декартовых координат точки в угловые. Их погрешность складывается из погрешности атласа Тайлераха (ПТайлераха), погрешности расчетов (Прасчетов) и погрешности вносимой неточности привязки координатной шапки к физиологическим маркерам головы человека. Погрешность, вносимая атласом Тайлераха, как отмечалось выше, равна 1-3 мм. Поскольку расчеты выполнялись с точностью выше шести знаков после запятой, их погрешностью можно пренебречь. Погрешность, вносимая координатной шапкой, по нашей оценке равна 2-3 мм. Поскольку все погрешности имеют случайный характер, суммарная величина ошибки может быть рассчитана по формуле:

$$P = \sqrt{P_{\text{Тайлераха}}^2 + P_{\text{Шапки}}^2} = 1,4 \div 4,2$$

Таким образом, разработанная нами технология имеет достаточную точность и не требует дорогостоящего оборудования.

Список литературы

1. **Акопян Б.В., Ершов Ю.А.** Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами. М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э.Баумана. 2005.
2. **Бехтерева Н.П., Аничков А.Д., Гурчин Ф.А., Дамбинова С.А., Илюхина С.А.** Лечебная электрическая стимуляция мозга и нервов человека/ под ред. Н.П. Бехтеревой. М.: АСТ; СПб.: Сова. Владимир:ВКТ. 2008. 464 с.
3. **Вальтер Х.** Функциональная визуализация в психиатрии и психотерапии, М.: АСТ: Астрель: Полиграфиздат, 2010. 416 с.
4. **Варганов А.А., Чайванов Д.Б., Варганов А.В.** Локализация на скальпе проекций поверхностных структур мозга по атласу Тайлераха. — НИЦ «Курчатовский институт». 2011.
5. **Гаврилов Л.Р., Цирильников Е.М.** Фокусированный ультразвук в физиологии и медицине // Л.: Наука. 1980.
6. **Каркищенко Н. Н., Варганов А. А., Варганов А.В., Чайванов Д.Б.** Локализация проекций полей Бродмана коры головного мозга человека на поверхность скальпа // Биомедицина. 2011. № 3. С. 40-46.
7. **Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Варганов А.А.** Об эффективности и безопасности ультразвуковой транскраниальной стимуляции головного мозга человека // Биомедицина. 2011. № 2. С. 4-18.
8. **Никитин С.С., Куренков А.Л.** Магнитная стимуляция в диагностике и лечении болезней нервной системы. 2003.
9. **Пинчук Д.Ю.** Транскраниальные микрополяризации головного мозга: клиника, физиология. Человек. 2007. 496 с.
10. **Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А.** Нейромодулятор как инструмент психофизиотерапии. “Инновационные технологии в медицине”, 26-28 октября Санкт-Петербург. 2011.
11. **Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.** Математическая модель биофизических процессов при транскраниальной микрополяризации // Биомедицина. 2011. № 3. С. 6-12.
12. **Хилл К., Бэмбер Дж., Г. тер Хаар.** Ультразвук в медицине. Физические основы применения. — М.: Физматлит. 2008.

Choice of optimum technology of localisation transcranial neurostimulators on a human scalp

N.N. Karkischenko, D.B. Chayvanov, A.A. Vartanov

For the transcranial neurostimulation it is necessary to use the right method of placing electrodes on a scalp surface. In this work we've studied demanded precision of placing electrodes and technologies of placing electrodes on a scalp surface.

Key words: transcranial magnetic stimulation, transcranial electrostimulation, rhythmic electrostimulation, transcranial micropolarization, neuromodulation, localisation.



Обмен полиаминов в миокарде при моделировании регенераторно-пластической сердечной недостаточности у крыс

Д.П. Хлопонин¹, Ю.С. Макляков¹, Ю.Н. Кротова¹, В.Н. Каркищенко²

¹ – Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: д.м.н., профессор Хлопонин Дмитрий Петрович
khloponin@list.ru

Эндогенные полиамины (путресцин, спермидин и спермин) играют важную роль в персистирующем повреждении миокарда при регенераторно-пластической хронической сердечной недостаточности (СН). Одним из возможных механизмов индуцируемой β -адреноблокаторами кардиопротекции при лечении СН является их влияние на метаболизм полиаминов. Установлено, что на фоне кардиоселективного β 1-адреноблокатора небиволола наблюдается частичное восстановление нарушенного при адриамицин-индуцированной регенераторно-пластической СН баланса уровней путресцина, спермидина и спермина в миокарде крыс.

Ключевые слова: полиамины, небиволол, β -адреноблокатор, адриамицин, сердечная недостаточность, апоптоз.

Эндогенные полиамины, к которым относятся путресцин, спермин и спермидин (а также зачастую агматин), представляют собой группу биологически активных веществ, имеющих большое значение для процессов роста клеток, их пролиферации, дифференцировки и гибели, а также клеточной адаптации к действию различных стрессорных и аверсивных факторов [3, 5]. За последние годы появилось большое число литературных публикаций, посвященных роли дисбаланса полиаминов в патогенезе самых разных заболеваний и патологических состояний у человека и животных, особенно онко-

логического, неврологического, нефрологического и гастроэнтерологического характера [2, 5, 7]. Однако, о месте нарушений обмена полиаминов в сердечно-сосудистой патологии известно очень мало. Лишь в последние 10-15 лет в свет вышел ряд работ, посвященных нарушениям метаболизма в системе полиаминов в условиях острых ишемических и ишемически-реперфузионных повреждений сердца [4, 11]. Изучением обмена полиаминов при хронической кардиоваскулярной патологии, в частности хронической сердечной недостаточности (СН), по нашим данным, никто предметно не занимался. Тем более,

нет в литературе данных относительно возможного влияния на эти процессы лекарственных средств. А между тем есть основания полагать, что благоприятное влияние таких препаратов выбора для лечения СН как ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и β -адреноблокаторы (БАБ) может быть — по крайней мере, частично — связано с их влиянием на кардиальный метаболизм полиаминов.

Материалы и методы

Исследования проводились на 68 белых нелинейных крысах-самцах массой 150-190 г (на начало эксперимента), полученных из филиала «Андреевка» НЦБМТ РАМН. Животные содержались в стандартных условиях вивария (при естественном освещении, t воздуха +18-20°C и влажности 50-60%) в пластиковых клетках размером 55×45×15 см, с подстилкой из древесных опилок, по 4-6 особей в клетке. Крысы потребляли гранулированный комбикорм (производитель ООО «Лабораторснаб») и воду *ad libitum* в поилках объемом 200 мл. В эксперимент животных забирали после 7 дней карантина.

Регенераторно-пластическую СН у животных моделировали в соответствии с общепринятым протоколом [9] путем дробного (6-кратного) в течение 2 недель введения адриамицина (АДР) («Доксорубин-Лэнс», «Лэнс-Фарм», Россия) в курсовой дозе 15 мг/кг внутривентриально (АДР-группа, $n=12$). Раствор АДР готовили согласно инструкции фирмы-производителя, растворяя содержимое 1 флакона (10 мг) в 5 мл растворителя (0,9% изотонического раствора NaCl).

Животные, служившие в качестве контроля I уровня (K_0 -группа, $n=10$),

вместо АДР в аналогичном режиме (6-кратно в течение 2 недель) и в сравнимом объеме получали внутривентриальные инъекции 0,9% изотонического раствора NaCl.

Основная (опытная) группа животных была разделена на 3 подгруппы (H_1 , H_2 и H_3 , по 12 крыс в каждой), в течение всего срока наблюдения ежедневно получавшие параллельно с АДР кардиоселективный БАБ небиволол (Н) («Небилет», Berlin-Chemie AG, Германия) в суточных дозах 1; 0,1 и 10 мг/кг *per os*, соответственно. Введение Н начинали за 2-е суток до 1 инъекции АДР, производили ежедневно и прекращали за 24 ч до умерщвления животных. Забор материала (миокарда левого желудочка) производили на 8-9 неделях эксперимента.

В группе контроля II уровня K_H крысам ($n=10$) АДР не вводили, и они получали только Н в режиме, аналогичном группе H_1 (в дозе 1 мг/кг/сут *per os*).

Определение уровней путресцина, спермидина и спермина в гомогенатах миокарда производили методом ионно-обменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) с обращенной фазой [6], с предварительной дериватизацией аминов с о-фталевым диальдегидом, использованием натрия додецилсульфата как ионно-обменного и растворяющего градиента. HPLC-аппарат состоял из жидкостного хроматографа ThermoQuest, Inc. Spectra System LC (Италия), колонки Luna C18, флуоресцентного детектора 420-AC и основной рабочей станции (Waters Inc, Milford, MA, USA). Измерение концентрации полиаминов производили количественно на основе их стандартов.

Статистическую обработку полученных результатов исследований

проводили с использованием общепринятых методов параметрической (t-критерий Стьюдента) и непараметрической (критерий Mann–Whitney (U)) статистики при помощи пакета статистических программ Statistica 6.0 (Statsoft, USA).

Результаты и их обсуждение

На модели регенераторно-пластической СН у крыс (группа АДР) было зафиксировано резкое и специфическое изменение содержания и баланса эндогенных полиаминов (табл.) по сравнению с группой контроля (K₀).

Так, концентрация путресцина в ткани миокарда резко (на 45,2%) повышалась (с 3,315±0,93 до 6,05±1,14 нмоль/г ткани, p<0,05), в то время как уровни спермидина и спермина, наоборот, явно и достоверно снижались – на 56% (с 471,11±115,6 до 206,96±68,77 нмоль/г ткани; p<0,05) и 44% (с 357,55±101,13 до 200,34±96,65 нмоль/г ткани; p<0,05) соответственно.

Применение на фоне кардиотоксических доз АДР высокоселективного β1-адреноблокатора небиволола во всех 3-х используемых дозах характеризовалось тенденцией к восстановлению нарушенного баланса между миокардиальным содержанием отдельных полиаминов. Так, в суточной дозе 1 мг/кг *per os* (приблизительно соответствующей среднетерапевтической дозе, используемой при фармакотерапии хронической СН у человека) Н приводил к достоверным сдвигам уровней всех анализируемых полиаминов. Концентрация путресцина уменьшалась более чем на четверть (с 6,05±1,14 до 4,52±1,15 нмоль/г; p<0,05) в отличие от уровней спермидина и спермина, достоверно повышавшихся почти в 2 (с 206,96±68,77 до 380,92±89,04 нмоль/г; p<0,01) и 1,5 раза (с 200,34±96,65 до 294,6±77,09 нмоль/г; p<0,05) соответственно.

Прием на порядок более низкой дозы Н (0,1 мг/кг *per os* в сутки) в группе Н2 приводил к качественно сходным изме-

нениям, хотя количественно полученные данные достоверными не являлись. Снижение содержания путресцина составило всего около 15%, а повышение концентрации спермидина и спермина – лишь 12,3% и 10,7% соответственно.

Показатели кардиальных уровней полиаминов, зарегистрированные в группе Н3, получавшей максимальную из вводимых дозу Н (10 мг/кг *per os* в сутки), практически не отличались от таковых в группе Н1. Они также были достоверны по сравнению с группой АДР, однако 10-кратное увеличение дозы Н не приводило к сопоставимому (или хотя бы в той или иной степени близкому к таковому) усилению эффекта.

Полученные в ходе нашей работы результаты динамики концентраций полиаминов в миокарде крыс при АДР-индуцированной регенераторно-пластической СН, на наш взгляд, объяснимы с позиций дуалистичной активности этих биологически активных веществ и их частую дифференцированного влияния на процессы клеточного роста и клеточной гибели, в первую очередь, апоптоза. Они вполне согласуются с данными литературы о том, что истощение запасов спермидина и спермина может провоцировать торможение клеточного роста и индуцировать апоптоз [10]. Причем, если проапоптотическую активность полиаминов связывают, главным образом, с путресцином, то в качестве активаторов клеточного роста чаще всего фигурируют т.н. высшие полиамины – спермидин и спермин.

Также при интерпретации полученных результатов следует учитывать наличие в метаболизме полиаминов в сердечной мышечной ткани (как и в прочих органах и тканях) человека такой специфичной черты как «цикл ин-

терконверсии», в ходе которого происходит взаимопревращение полиаминов друг в друга: путресцин вначале преобразуется в спермидин, а последний далее – в спермин за счет последовательного присоединения пропиламиновых групп в ходе реакций, катализируемых, спермидин- и сперминсинтазой соответственно.

Примечательно, что этот цикл предусматривает и «ретроконверсию» (обратное преобразование спермина и спермидина в путресцин), в процессе которой высшие полиамины вначале под влиянием спермидин/спермин-ацетилтрансферазы ацетируются, а затем их ацетилированные формы под действием полиаминоксидазы преобразуются в путресцин. Принципиально важно, что в ходе ретроконверсии высших полиаминов происходит образование больших количеств и накопление в тканях мощных индукторов повреждения и апоптоза клеток перекиси водорода (H₂O₂) и 3-амино-пропиональдегида [8].

Таким образом, можно предполагать, что в условиях экспериментальной СН антрациклинового генеза у крыс происходит формирование дисбаланса между содержанием низшего (путресцина) и высших (спермидина со спермином) полиаминов в миокарде. В итоге сдвиг равновесия в пользу путресцина приводит к повышению его уровня в сердечномышечной ткани и накоплению в миокарде токсических метаболитов, индуцирующих апоптоз кардиомиоцитов, что вполне согласуется с данными, в том числе и продемонстрированными нами [1], о принципиальной роли апоптотической клеточной гибели в патогенезе адриамициновой кардиотоксичности. На фоне же действия БАБ небиволола

Таблица

Содержание полиаминов в гомогенатах сердечной мышечной ткани крыс различных экспериментальных групп

№	Группа	Группа расшифровка	Путресцин, нмоль/г	Спермидин, нмоль/г	Спермин, нмоль/г
1	K ⁰	контроль	3,31±0,53 ²	471,11±35,6 ²	357,55±31,1 ²
2	АДР	адриамицин	6,05±0,64 ¹	206,96±28,77 ¹	200,34±26,65 ¹
3	K _n	контроль (небиволол)	3,93±0,58	564,03±46,57 ²	316,16±37,8 ²
4	H ₁	небиволол I	4,52±0,65	380,92±39,04 ¹²	294,6±27,1 ²
5	H ₂	небиволол II	5,13±0,56	235,87±33,17 ¹	224,35±27,5 ¹
6	H ₃	небиволол III	4,16±0,47	396,72±52,52 ¹²	298,24±20,3 ²

Примечание: Данные в таблице представлены в виде M±m для всех групп животных:

¹ – достоверные отличия от группы контроля K₀ (p<0,05);

² – достоверные отличия от группы АДР (p<0,05).

вышеописанные негативные сдвиги в содержании полиаминов подавляются и, более того, наблюдается частичная реверсия (с тенденцией, но не полноценным восстановлением) нормальных уровней путресцина, с одной стороны, и спермидина со спермином, с другой.

Выводы

Длительное курсовое применение высококардиоселективного БАБ небиволола на фоне регенераторно-пластической сердечной недостаточности адриамицинового генеза у крыс обуславливает частичное восстановление нарушенного баланса между концентрациями путресцина и высших полиаминов (спермидина со спермином) в миокарде крыс. Как следствие этого, небиволол-индуцируемое повышение уровней спермидина со спермином, сдерживающих апоптогенный потенциал путресцина и стимулирующих процессы клеточной пролиферации, приводит к торможению апоптотической гибели клеток миокарда и, по всей видимости, может быть расценено в качестве одного из компонентов механизма реализации кардиопротекторной активности БАБ в целом.

Список литературы

1. **Хлопонин Д.П.** Гистохимический анализ влияния β -адреноблокаторов III поколения на интенсивность апоптоза в миокарде крыс при моделировании сердечной недостаточности // Психофарм. и биол. наркол. 2007. Т. 7 (спец.вып., ч. 2). с. 2-1999.
2. **Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Sailor K.** Polyamines and central nervous system injury: spermine and spermidine decrease following transient focal cerebral ischemia in spontaneously

hypertensive rats // Brain Res. 2002. Vol. 938. P. 81-86.

3. **Gugliucci A.** Polyamines as clinical laboratory tools // Clin. Chim. Acta. 2004. Vol. 1-2. P. 23-35.
4. **Han L., Xu C., Jiang C., Li H., Zhang W., Zhao Y., Zhang L., Zhang Y., Zhao W., Yang B.** Effects of polyamines on apoptosis induced by simulated ischemia / reperfusion injury in cultured neonatal rat cardiomyocytes // Cell Biol. Internat. 2007. Vol. 31. № 11. P. 1345-1352.
5. **Igarashi K.** Physiological functions of polyamines and regulation of polyamine content in cells // Yakugaku Zasshi. 2006. Vol. 126. № 7. P. 455-471.
6. **Kwon H., Wu G., Bazer F.W., Spencer T.E.** Developmental changes in polyamine levels and synthesis in the ovine conceptus biology of reproduction // Biol. Reproduct. 2003. Vol. 69. P. 1626-1634.
7. **Moinard C., Cynober L., De Bandt J.-P.** Polyamines: metabolism & implications in human diseases // Clin. Nutr. 2005. Vol. 24. P. 184-197.
8. **Niiranen K., Pietila M., Pirttila T.J., Jarvinen A., Halmekyto M., Korhonen V.-P., Keinanen T.A., Alhonen L., Janne J.** Targeted Disruption of Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase Gene in Mouse Embryonic Stem Cells. Effects on Polyamine Homeostasis & Sensitivity to Polyamine Analogues // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 25323-25328.

9. **Siveski-Iliskovic N., Kaul N. & Singal P.K.** Probulcol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats // Circulation. 1994. Vol. 89. P. 2829-2835.
10. **Wang Z., Zahedi K., Barone S., Tehrani K., Rabb H., Matlin K., Casero R.A., Soleimani M.** Overexpression of SSAT in kidney cells recapitulates various phenotypic aspects of kidney

ischemia-reperfusion injury // J. Am. Soc. Nephrol. 2004. Vol. 15. P. 1844-1852.

11. **Zhao Y.J., Xu C.Q., Zhang W.H., Zhang L., Bian S.L., Huang Q., Sun H.L., Li Q.F., Zhang Y.Q., Tian Y., Wang R., Yang B.F., Li W.M.** Role of polyamines in myocardial ischemia/reperfusion injury and their interactions with nitric oxide // Eur. J. Pharmacol. 2007. Vol. 562. № 3. P. 236-246.

Nebivolol influence on myocardial polyamines metabolism in a rat model of regenerative & plastic heart failure

D.P. Khloponin, Yu.S. Maklyakov, Yu.N. Krotova, V.N. Karkischenko

Endogenous polyamines (putrescine, spermidine, & spermine) plays an important role in the process of ongoing myocardial injury in the regenerative & plastic heart failure. One of the possible mechanisms of β -blockers induced cardioprotection in the failing heart is their modulation effect on the polyamines metabolism. Cardioselective β_1 -blocker nebivolol is shown to partially normalize an essentially disturbed myocardial level of putrescine, spermidine & spermine in adriamycin-induced regenerative & plastic heart failure in rats.

Key words: polyamines, nebivolol, β -blocker, adriamycin, heart failure, apoptosis.

Особенности экспериментального моделирования соматических и неврологических заболеваний для оценки эффективности лекарственных препаратов

С.В. Чепур, В.Н. Быков, М.А. Юдин, А.С. Никифоров, И.В. Фатеев, А.А. Арутюнян

Научно-исследовательский испытательный центр (медико-биологической защиты)
Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной
медицины Минобороны России, Санкт-Петербург

Контактная информация: Сергей Чепур svch-spb@mail.ru

Систематизированы сведения об экспериментальном моделировании жировой дистрофии и цирроза печени, панкреатита с сахарным диабетом, демиелинизирующих заболеваний нервной системы. Моделирование экспериментальной патологии осуществляется посредством аппликации лекарственных препаратов и химических соединений в установленных дозах. Двухэтапное формирование инсульта головного мозга на крысах осуществляли последовательной перевязкой общих сонных артерий. Стандартизацию моделей и выбор оптимальных сроков для оценки эффективности лекарственных препаратов осуществляли в ходе морфологических и биохимических исследований, выявляющих сходство моделируемых патологических изменений с таковыми у человека. Адекватность экспериментальных моделей оценена в ходе скрининга лекарственных препаратов.

Ключевые слова: диметилнитрозамин, стрептозоцин, паракват, органофосфаты, реперфузионный синдром.

По мере формирования отечественного производственного фармацевтического сектора усиливается интерес к разработке и испытанию оригинальных лекарственных средств. В связи с этим, особую актуальность приобретают исследования по созданию экспериментальных моделей патологических процессов, которые по своим проявлениям, реакциям клеточных популяций и биохимическому статусу в значительной степени соответствовали бы протеканию заболеваний у человека. Важность создания моделей *in vivo* для скрининга лекарственных препаратов определяется необходимостью выявления эффектов лекарств в условиях существования системного кровотока, сохранности микроциркуляторного русла, иннервации, а главное – функци-

онирующих гистогематических барьеров, воспроизведение которых в полной мере невозможно в органных и тканевых культурах *in vitro*. Немаловажное значение имеет возможность моделирования патологических состояний на мелких лабораторных животных, что необходимо для первичного отбора эффективных лекарственных препаратов среди синтезированных в небольшом количестве оригинальных химических соединений.

Отсутствие стандартизованных воспроизводимых экспериментальных моделей, в свою очередь, существенно затрудняет сравнительную оценку результатов многочисленных исследований эффективности лекарственных средств, а в ряде случаев ставит под сомнение прогноз проявления целевого эффекта у человека.

В этой связи, **цель** настоящего исследования состояла в разработке экспериментальных моделей заболеваний печени, поджелудочной железы, демиелинизирующих заболеваний нервной системы и инсульта головного мозга на крысах.

Для достижения указанной цели предстояло решить задачи по стандартизации условий воспроизведения патологических процессов на мелких лабораторных животных, а также, с учетом характеристик их протекания, определить оптимальные сроки испытания эффективности лекарств и наиболее информативные регистрируемые показатели, а также методы лабораторного исследования.

Материал и методы

Исследования выполнены на паспортизированных линиях белых крыс *Sprague Dawley* и *Wistar*, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино».

Поддержание указанных линий осуществляется в виварии НИИЦ (МБЗ), что также обеспечивает поступление животных линии *Wistar* для проведения экспериментов. Эксперименты выполнены на самцах массой 180–220 г. Животных содержали в условиях вивария на сухом корме без ограничения водопотребления. В стандартные пластмассовые клетки помещали не более 6 крыс, в качестве подстилки использовали автоклавированные березовые стружки.

Для получения репрезентативных выборок в группы включали по 10 животных. Моделирование патологических процессов осуществляли введением крысам химических соединений по схемам в соответствии с данными табл. 1. Моделирование инсульта головного мозга осуществляли двухэтапно, посредством лигирования одной из сонных артерий с последующим через 1–5 сут. перевязкой общей сонной артерии на контралатеральной стороне.

Таблица 1

Дозы и порядок введения лекарственных препаратов для моделирования соматических и неврологических заболеваний

Вариант патологического процесса	Вещество, применяемое для моделирования	Доза, мг/кг	Режим введения
Жировая дистрофия печени	тетрахлорметан	2000	50% масляный раствор, подкожно по 0,4 мл/100 г массы тела ежедневно в течение 4 сут.
Цирроз печени	диметилнитрозамин	10	Три раза в неделю, внутримышечно, в течение 3–4 нед.
Панкреатит с выраженной гипергликемией	стрептозоцин	70–140	Однократно, внутримышечно
Дыхательная недостаточность	паракват	20	Однократно, внутривентриально
Рассеянный склероз	хлорофос, мипафокс	0,8 ЛД ₅₀	0,4 ЛД ₅₀ подкожно, затем 0,4 ЛД ₅₀ через 1 ч после первой инъекции, внутримышечно

Для характеристики протекания патологического процесса группы животных выводили из опыта на 1, 3, 7, 14 и 28-е сутки эксперимента. Регистрировали изменение массы тела крыс, количество потребляемой жидкости, состав и свойства мочи, собираемой в обменных клетках, а также специфические проявления патологических процессов. Вывод животных из опыта осуществляли одномоментной гильотинной декапитацией с отбором крови для гематологического и биохимического исследования, а также проведением комплекса патоморфологических и гистологических исследований органов и тканей для определения характеристик протекания патологического процесса. При гистологическом исследовании материал фиксировали 12% нейтральным формалином (BioVitrum), парафиновые срезы 5-7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, по ван Гизон, по Маллори, а также другими красителями в соответствии с вариантом патологического процесса. Срезы оценивали на микроскопе PolyVar с применением цифровой фотокамеры с архивацией изображений для их последующего морфометрического анализа. Гематологические исследования выполнены с применением гематологического анализатора Mythic 18, биохимические исследования выполнены на автоматическом биохимическом анализаторе BioScan с использованием программ для анализа крови крыс.

При анализе результатов изменения характеристик животных в группах использовали непараметрическую статистику Манна-Уитни, при анализе динамики клеточных популяций для сравнения выборок использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Особое внимание уделяли характеристикам протекания патологических

процессов и возможности применения разработанных моделей для оценки эффективности лекарственных препаратов.

Жировая дистрофия печени. Классическая жировая дистрофия печени воспроизводится при подостром отравлении крыс тетрахлорметаном. Для моделирования применяют 50% раствор тетрахлорметана в подсолнечном масле, который вводят подкожно в объеме 0,4 мл/100 г массы тела, ежедневно в течение 4 сут. Применение масел богатых ненасыщенными жирными кислотами снижает токсическое действие хлорированного углеводорода. Как правило, гибели крыс при проведении эксперимента не наблюдали. Результаты моделирования могут применяться для оценки эффективности гепатопротективных средств на 7-е сут. эксперимента и сохраняют выраженность у животных контрольных групп на протяжении не менее 14-ти сут.

При отравлении крыс тетрахлорметаном в печени развиваются типичные воспалительно-дистрофические реакции. Макроскопически печень выглядела кирпично-оранжевой с мелкими западинами на поверхности, на ощупь орган тестоватой консистенции.

При гистологическом исследовании в участках, которые не были целиком подвержены некрозу, удавалось четко проследить зональность поражений и предположить последовательность структурных изменений. В большинстве клеток периферической зоны развиваются дистрофические изменения, преимущественно в виде белково-гидропической дистрофии. В цитоплазме большинства гепатоцитов выявлены просветления с нечеткими контурами. Необходимая часть цитозоля в виде глыбок смещена к периферии клетки. Ядро часто располагается полярно и в большинстве случаев пикнотично изменено.

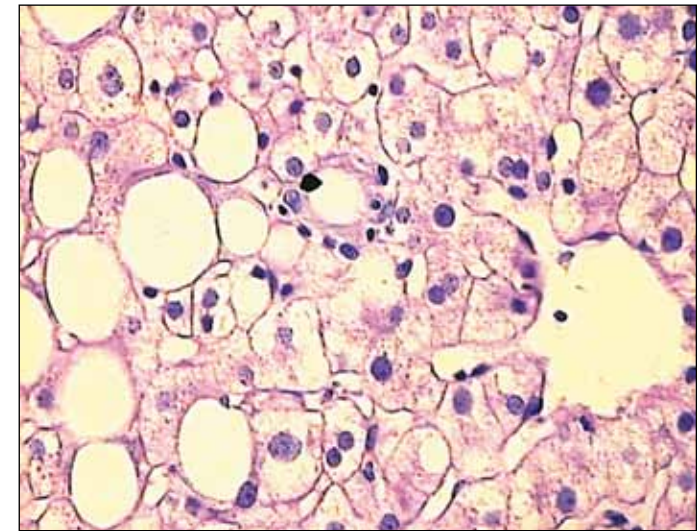


Рис. 1. Расширение центральной вены и крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов печени крыс, сопровождающаяся умеренно-выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. Подострое отравление тетрахлорметаном, 7 сут. эксперимента. Окраска гематоксилин-эозин, ув. об. x 40.

По мере удаления от центра дольки происходит смена гистопатологических изменений. В умеренно гиперхромных клетках определяли глыбчатую агрегацию матрикса, соответствующую картине зернистой дистрофии. Часто в этих же клетках выявляли мелкие и средней величины вакуоли с ровными контурами. При окрасках суданами эти вакуоли интенсивно окрашивались. В ряде клеток выявлены крупные жировые вакуоли, оттесняющие ядра клеток к цитолемме. При разрушении этих клеток свободнолежащие капли жира определяются в межклеточном пространстве в виде жировых кист (рис. 1).

Средний диаметр воротной вены увеличивается в 3-4 раза и составляет 183 ± 17 мкм (43 ± 9 мкм у интактных животных). Значительно расширяются также просветы венозных синусоидов и пространств Диссе. В сосудах отмечены явления стаза крови и агрегации форменных элементов. Большинство эндотелиоцитов набухшие.

Таким образом, при отравлении четыреххлористым углеродом у животных возникает картина токсического гепатита с развитием колликвационного некроза и дистрофических изменений гепатоцитов с преобладанием жировой дистрофии, сопровождающимися формированием воспалительной клеточной инфильтрации. Элементы желчевыводящей системы часто остаются сохранными. Подобные изменения сходны с гистологическими проявлениями HCV-инфекции у человека, в особенности при ее протекании на фоне сахарного диабета.

Подобная модель позволяла выявить активность ряда гепатопротекторов, в частности гепатофальк-планта, и оценить цитопротективное действие этимизола, данные о котором были систематизированы в диссертационном исследовании Е.В. Саблиной [5].

Цирроз печени. Моделирование цирроза печени на крысах представляет собой непростую задачу, решение которой во многом определяет возможность



Рис. 2. Неровность поверхности печени и изменение ее цвета (А), сопровождающиеся спленомегалией (Б) и формированием асцита (В) у крыс на 21-е сут. подострого отравления ДМНА.

комплексной оценки гепатопротективных средств и побочных эффектов лекарственных препаратов. К сожалению, для моделирования цирроза достаточно часто применяются различные варианты введения хлорированных углеводов, применение которых формирует поральный фиброз и крайне редко сопровождается истинными цирротическими изменениями гистоархитектоники печени с формированием соединительнотканых септ, отграничивающих псевдодольки. В этой связи, результаты исследований

противоцирротической активности препаратов, выполненных на таких моделях, зачастую без должного гистологического контроля, следует признать несостоятельными.

Гистопатологические изменения в печени крыс, сходные с таковыми при формировании постнекротического цирроза печени у человека, возникают на фоне подострого отравления диметилнитрозоамином (ДМНА), который вводят внутримышечно в дозе 10 мг/кг три раза в неделю на протяжении 3-4 недель

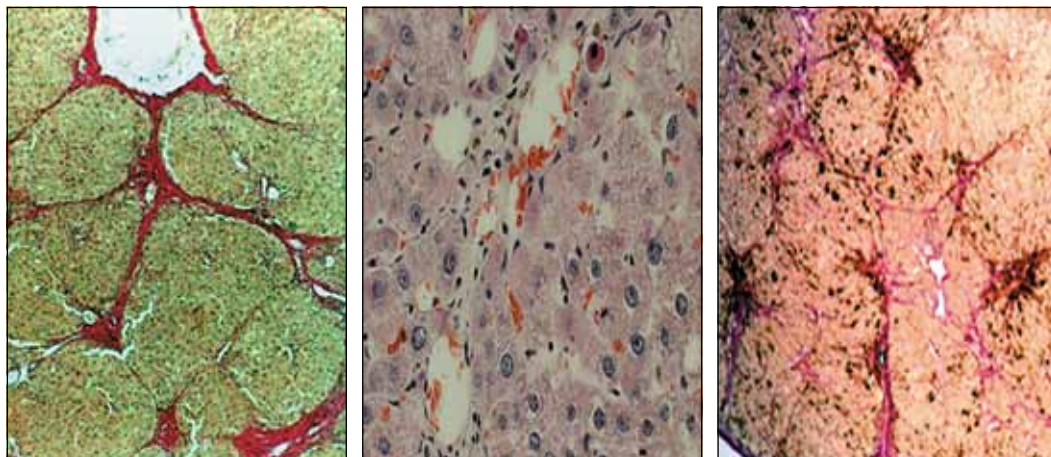


Рис. 3. Формирование псевдодолек (А), разделенных соединительноткаными септами, в которых выявляются признаки поражения сосудов и неоангиогенеза (Б), клетки Купфера насыщены гемосидерином (В). 21 сут. подострого отравления ДМНА, окраска по ван Гизон (А, В) и гематоксилин-эозином (Б). Ув. об. х 16 (А, В), х 40 (Б).

в зависимости от требуемой глубины поражения. Необходимо также отметить, что летальность крыс, которые подверглись подострому введению ДМНА, составила 40%, при этом гибель животных регистрировали, в среднем, через $17,65 \pm 0,26$ сут. после начала эксперимента. Важно отметить, что в отличие от человека, патологические изменения у крыс сохраняются на протяжении 1,0-1,5 мес., после чего подвергаются регрессии. Вследствие этого, при необходимости оценки лекарственных препаратов на протяжении длительного периода требуется продолжение введения ДМНА.

При аутопсии крыс выявляли типичные цирротические изменения с форми-

рованием зернистой печени, спленомегалии и асцита (рис. 2), который крайне редко формируется при отравлениях четыреххлористым углеродом.

При гистологическом исследовании выявляли формирование соединительнотканых септ на месте некроза гепатоцитов. Формирование соединительной ткани сопровождалось васкулитом с инфильтрацией и множественным тромбозом сосудов, инициирующим компенсирующий его интенсивный неоангиогенез. Клетки Купфера в большинстве случаев содержали гемосидериновые включения (рис. 3).

При биохимическом исследовании выявляли признаки цитолиза и измене-

Таблица 2
Изменения биохимических показателей при введении лекарственных препаратов на фоне сформированного ДМНА-индуцированного цирроза печени

Показатель	Группы				
	Интактные	Контроль, ДМНА по схеме в течение 3 нед.	Нимесулид, 8,5 мг/кг два раза в день в течение 5 сут.	Дексаметазон, 2 мг/кг ежедневно в течение 5 сут.	Метронидазол + кларитромицин, по 100 мг/кг ежедневно 5 сут.
АЛТ, ммоль/л	67,7±0,95	109,3±6,40*	104,5±6,65 *	138,0±23,41*	148,3±9,54* ^Δ
АСТ, ммоль/л	183,0±9,37	239,3±28,51	246,3±15,62*	226,0±23,12	270,6±18,54*
Билирубин общ., мкмоль/л	4,3±0,42	7,2±1,42	4,3±1,05	6,0±1,59	5,3±1,22
Общ. белок, г/л	49,0±1,24	46,83±4,60	58,5±1,76* ^Δ	46,67±3,84	48,8±3,78
-ГТП, ед	5,8±0,91	12,2±1,03*	10,5±0,71*	10,3±1,52*	10,2±0,61*
ЩФ, ед	9,3±0,95	10,2±1,91	12,25±3,91	4,3±0,73* ^Δ	10,6±1,65
Глюкоза, ммоль/л	5,3±0,38	7,1±0,70*	7,7±0,48*	6,3±0,94	7,8±0,73*
Холестерин, ммоль/л	1,1±0,07	1,4±0,20	1,3±0,22	1,1±0,23	2,0±0,24*

Примечание: * – различия с группой интактных животных достоверны при $p \leq 0,05$;
^Δ – различия с группой контрольных животных достоверны при $p \leq 0,05$.

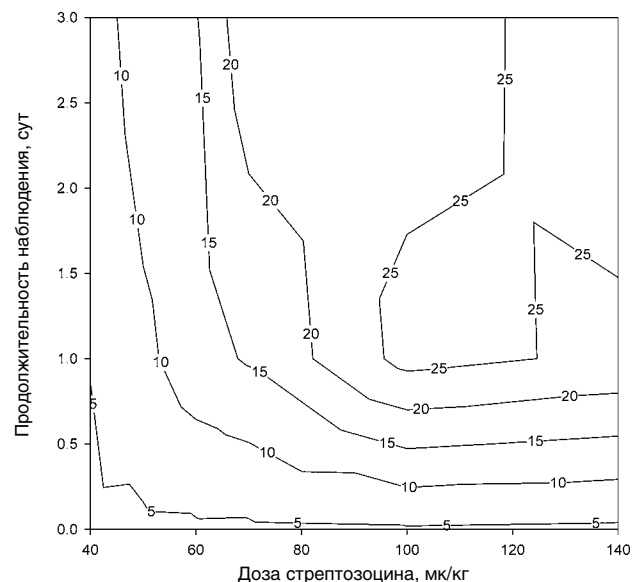


Рис. 4. Изменение концентрации глюкозы (моль/л) в крови крыс после однократного введения стрептозоцина в разных дозах в зависимости от продолжительности постинтоксикационного периода.

ния системы гемостаза, проявляющиеся в увеличении временных характеристик свертывания крови.

Указанная модель была применена для оценки эффективности тиопозтинов [2] и позволила детально оценить гепатопротективную эффективность препаратов группы глутоксима. Кроме того, цирротическая модель может применяться для исследования побочных эффектов лекарственных средств. Результаты такого исследования препаратов, применяемых в комплексной терапии циррозов и ассоциированных с ними осложнений, приведены в табл. 2.

Панкреатит с выраженной гипергликемией. Моделирование сахарного диабета осуществляли посредством внутримышечного однократного введения стрептозоцина, индуцирующего необратимые нарушения структуры инсулярного аппарата поджелудочной железы. Стрептозоцин применяли в широком диапазоне доз от 40 до 140 мг/кг в зависимости от требуемых сроков формирования

стойкой гипергликемии в соответствии с номограммой (рис. 4). При отравлении животных стрептозоцином в дозе 140 мг/кг начиная с 4-х сут. отмечали гибель крыс, средняя продолжительность жизни животных составила $5,0 \pm 0,21$ сут. К исходу недели все отравленные стрептозоцином в этой дозе крысы погибли.

У животных всех опытных групп наблюдали развитие сходных структурных изменений в поджелудочной железе, соответствующих острому панкреатиту. На фоне недостаточного артериального кровоснабжения отмечали признаки венозного застойного полнокровия, которое сопровождалось диапедезными кровоизлияниями. Застой крови в венозном отделе сосудистого русла повышал вероятность внутрисосудистого тромбообразования. В ряде случаев на фоне выраженного сладж-синдрома и паретического расширения веноулярного отдела микроциркуляторного русла наблюдали признаки интерстициального отека междольковой и внутридольковой соедини-

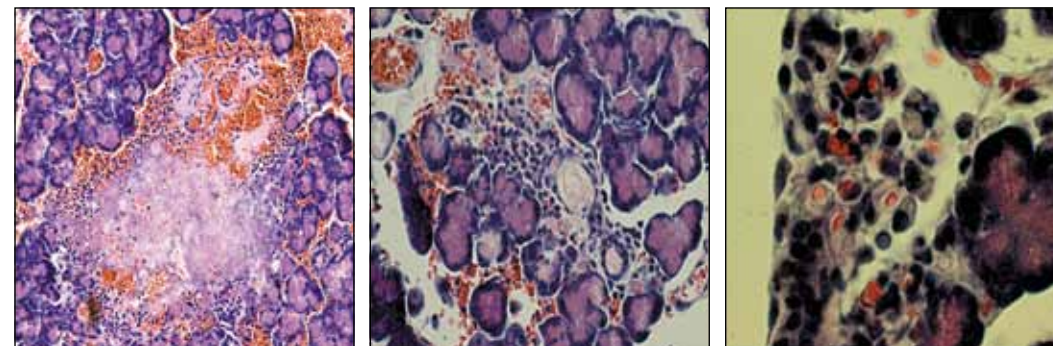


Рис. 5. Участок паренхимы поджелудочной железы крысы на 10-е сут. после острого отравления стрептозоцином в дозе 70 мг/кг. Зона творожистого некроза с геморрагическим пропитыванием (А), перидуктулярное скопление полиморфно-ядерных лейкоцитов (Б), отек соединительной ткани и дистрофические изменения клеток островка Лангерганса (В). Окраска гематоксилин-эозином, ув. об. х 40 (А) и х 100 (Б, В).

тельной ткани поджелудочной железы. В отечном интерстиции поджелудочной железы крыс определяли умеренное количество активированных мононуклеаров, набухшие элементы стромы и слущенные дистрофические и некробиотически измененные ацинарные клетки. Клетки

островков Лангерганса подвергались дистрофическим изменениям на фоне выраженного отека стромы (рис. 5).

Результаты применения различных фармакологических зондов на фоне стрептозоцинового диабета представлены в табл. 3. Применение цитостатика

Таблица 3

Влияние фармакологических препаратов на уровень гликемии у крыс после острого отравления стрептозоцином в дозе 140 мг/кг

Группа	Фоновые значения	Продолжительность эксперимента, сут.	
		1	3
Интактные	4,3±0,1	4,2±0,4	4,5±0,3
Контроль, Стрептозоцин 140 мг однократно, внутримышечно	4,2±0,1	24,0±1,2*	28,2±1,7*
Эстрадиол, 0,17 мг/кг, внутривбрюшинно, ежедневно в течение 5 сут.	4,9±0,2	24,1±1,0*	28,2±3,4*
Метотрексат, 2,5 мг/кг, внутривбрюшинно, ежедневно в течение 5 сут.	4,4±0,1	19,4±1,2*	16,1±1,3 [△]
Кофеин, 35 мг/кг, внутривбрюшинно, ежедневно в течение 5 сут.	4,0±0,2	23,4±1,3*	20,9±3,5*

Примечание: * – различия с фоновыми значениями достоверны при $p \leq 0,05$; [△] – различия с группой контрольных животных достоверны при $p \leq 0,05$.

Таблица 4

Характеристика компенсированной модели дыхательной недостаточности у крыс после внутрибрюшинного введения параквата в дозе 20 мг/кг ($M \pm mM$, $n=6$)

Показатель	Фоновые значения	3-е сут. после отравления
ЧСС, уд./мин.	477,8±3,56	379,2±10,98*
ЧД, в мин.	139,2±3,61	202,5±7,91*
ДО, мл	0,41±0,315	0,14±0,011*
МОД, мл/мин.	43,9±2,10	28,0±2,29*
Масса тела, г	197,5±2,94	166,9±4,00*

Примечание: * – различия с фоновым значением достоверны при $p \leq 0,05$.

метотрексата снижает выраженность воспалительных изменений и способствует снижению уровня гипогликемии, эффект препарата более выражен на 3-и сутки наблюдения.

Дыхательная недостаточность. Моделирование экспериментального поражения легких проводили путем внутрибрюшинного введения параквата. Отравление паракватом у крыс относится к моделям паренхиматозного поражения легких с развитием альвеолита и фиброза, приводящих к развитию дыхательной недостаточности [8]. При отравлении паракватом отмечали дозозависимые эффекты: тахипное (частота дыхания более 200 в мин.) развивалась при введении яда в дозе 17,8±5,26 мг/кг, отек легких развивается при введении яда в дозе 38,5±14,59 мг/кг. Гибель животных отмечали, начиная с 1-2 сут. после введения параквата и до 5-8 сут. включительно. Введение яда в дозе 40 мг/кг и выше сопровождалось гибелью животных в течение 1-2 сут. после отравления на фоне развития отека легких, среднелетальная доза параквата составила 23,4±5,40 мг/кг.

Основные функциональные характеристики органов дыхания крыс при введении параквата систематизированы в табл. 4. Более выраженные изменения могут быть получены посредством предъявления крысам различных физи-

ческих нагрузок или увеличением дозы параквата.

Модель дыхательной недостаточности, вызванной паракватом, использована для анализа эффективности бронходилататоров, analeптиков, сердечных гликозидов и ряда инотропных средств.

Демиелинизирующее поражение нервной системы. Воспроизводимой моделью демиелинизирующих поражений нервной системы, близких по морфологической сущности к рассеянному склерозу, может служить отдаленная органофосфатная нейропатия. Развитие этого патологического состояния сопряжено с предъявлением модифицированных аутоантигенов нервной ткани при разрушении гематоэнцефалического барьера. Исследования патогенеза нейропатий в настоящее время не могут дать убедительный ответ на вопрос в какой момент и каким образом осуществляется антигенпрезентация: контакт структур «забарьерной» ткани с иммунокомпетентными клетками в острую фазу интоксикации, презентация модифицированных (фосфорилированных, нитрозилированных и т.д.) белков в остром и раннем постинтоксикационном периоде, появление аномальных белков вследствие повреждения ядерного аппарата клеток. В сущности, у 30-67% крыс, отравленных хлорофосом

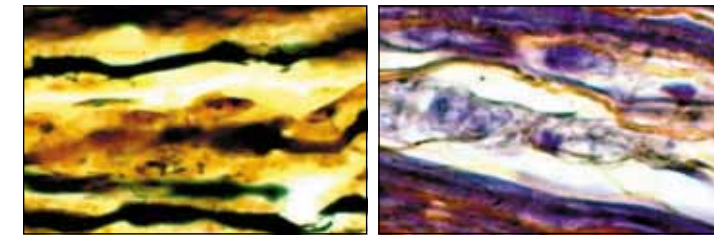


Рис. 6. Разрушение миелиновой оболочки при сохранении непрерывности осевого цилиндра вследствие первичной демиелинизации (А), осуществляемой при участии фагоцитов, расположенных в непосредственной близости к нейритах (А, Б). 28-е сут. после отравления крыс мипафоксом. Окраска по Бильшовскому-Грос (А) и по Маллори (Б), ув. об. х 100.

или мипафоксом, развиваются расстройства чувствительности и движений, морфологической основой которых являются процессы первичной демиелинизации. Учитывая, что отдаленные нейропатии представляют собой вариант нехолинергического эффекта ФОС, при моделировании осуществляют двукратное введение яда. Первую дозу (0,4 ЛД₅₀) вводили подкожно для постепенной инактивации холинэстеразы, не вызывая значимых проявлений интоксикации. Вторую, разрешающую, дозу яда (0,4 ЛД₅₀) вводят через 1 ч после первой, для достижения максимального связывания яда с нехолинергическими структурами. Вторая инъекция органофосфатов вызывает развитие тремора и в ряде случаев судорог, однако, с учетом десенситизации холинорецепторов на фоне первого введения яда, гибели отравленных животных не отмечали. Проявления демиелинизирующих поражений развиваются на 21–28-е сут. эксперимента и сохраняются на протяжении 90 сут. наблюдения. Резкое снижение скорости проведения нервного импульса доказано в ходе электрофизиологических исследований. В крови существенно увеличивается количество циркулирующих иммунных комплексов.

При морфологическом исследовании в периферических нервных проводниках отмечали проявления васкулита и отека

соединительной ткани. При импрегнации выявляли выраженные нарушения структуры миелиновых цилиндров и появление фагоцитирующих элементов в непосредственной близости к нервным волокнам (рис. 6). При иммунологическом исследовании выявляли изменение антигенного состава нервной ткани с появлением дополнительных полос преципитатов в полиакриламидном геле.

С использованием модели отдаленных органофосфатных нейропатий оценена эффективность глюкокортикоидных препаратов, нестероидных противовоспалительных средств и антиоксидантов различной структуры.

Острое нарушение мозгового кровообращения. Среди многообразия моделей ишемического повреждения головного мозга, используемых для оценки эффективности лечебных препаратов, наиболее часто применяемыми являются модель тотальной ишемии головного мозга с перевязкой общих сонных артерий и модель локального нарушения кровообращения с перевязкой средней мозговой артерии. Моделирование локального нарушения с перевязкой средней мозговой артерии сопровождается рядом технических трудностей и требует специальных микрохирургических инструментов. Перевязка же сонных артерий является более простой по выполнению хирургической операци-

ей, а также позволяет сформировать патогенетически сходную с ишемическим инсультом редукцию церебрального кровообращения [7, 9]. Однако вследствие хорошо развитого коллатерального кровообращения у животных (в частности, у крыс), односторонняя перевязка общих сонных артерий не приводит к выраженным изменениям, что затрудняет дифференцировку экспериментальных групп. Одномоментная двухсторонняя перевязка общих сонных артерий по данным разных авторов приводит к гибели экспериментальных животных в 70–100% случаев, преимущественно в течение первых 2–3 сут., что затрудняет изучение динамики восстановительного периода и оценку эффективности терапии [1, 4, 6, 10, 11]. При попытке моделирования ишемического повреждения головного мозга путем одномоментной перевязки общих сонных артерий отмечали гибель 100% животных в течение 1 сут. после операции. Поэтапная же перевязка общих сонных артерий была использована для описания коллатерального кровообращения головного мозга при ишемическом повреждении [3], однако вторая перевязка была произведена только на 77-е сут., что также создает определенные трудности для адекватной оценки эффективности лечебной терапии. Вышеизложенные обстоятельства позволили рассмотреть модель ишемического повреждения головного мозга при поэтапной перевязке общих сонных артерий, как возможную для оценки фармакологической активности лекарственных средств.

Было проведено несколько серий экспериментов с поэтапной перевязкой общих сонных артерий у крыс. В первой серии экспериментов проводили перевязку правой общей сонной артерии и через 1 сут. перевязку левой общей сонной ар-

терии. Во второй серии опытов интервал между перевязками составлял 2-е сут., в третьей — 3-е сут., в четвертой серии — 5 сут.

Показано, что степень тяжести нарушения кровоснабжения головного мозга зависит от интервала между перевязками сонных артерий. В случаях, когда интервал между перевязками составлял 1–2 сут., наблюдали развитие заторможенности и нарушения координации движений животных, что представляло сложность в оценке их поведения в тесте «открытое поле» и регистрации условных рефлексов пассивного избегания. При данном режиме моделирования отмечали достоверное снижение массы тела животных и увеличение послеоперационной гибели до 50–60%. Модель поэтапной перевязки с интервалом не менее 3 сут. снижает уровень летальности оперированных животных и позволяет использовать этологические методики для оценки их высшей нервной деятельности.

С помощью разработанной экспериментальной модели показано, что ишемические повреждения головного мозга повышают уровень возбудимости центральной нервной системы, что является причиной нарушения поведенческих и мнестических функций. По-видимому, эти изменения связаны с формированием в коре головного мозга, гиппокампе и ядрах таламуса очаговых и диффузных деструктивных изменений. Используемая модель ишемии хорошо воспроизводима и может применяться для исследования механизмов ишемических повреждений головного мозга и оценки эффективности лекарственных средств различных фармакологических групп (антиоксиданты, ингибиторы синтазы оксида азота, блокаторы кальциевых каналов и др.).

Разработанные экспериментальные модели основаны на схожести патоморфологических характеристик протекания патологических процессов у животных и у человека. Стандартизация и изучение экспериментальной патологии позволит унифицировать сравнение эффективности лекарственных препаратов, определить направления синтеза наиболее эффективных биологически активных соединений.

Разработанные модели являются воспроизводимыми и позволяют с использованием стандартизованных лабораторных животных провести скрининг препаратов.

Выводы

Экспериментальное моделирование патологических процессов для отбора лекарственных препаратов *in vivo* должно основываться на схожести универсальных реакций клеточных популяций в условиях сохранения единства организменного континуума.

Список литературы

1. Горбачева С.В., Беленичев И.Ф., Дунаев В.В., Бухтиярова Н.В. Фармакологическая коррекция повреждений нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения // Экспер. и клин. фармакол. 2007. Т. 70. № 6. С. 13–16.
2. Кетлинская О.С. Клинико-экспериментальное обоснование регионарного и системного введения препаратов из группы тиопозтинов при циррозе печени: сообщение I / О.С. Кетлинская, В.А. Кащенко, А.Е. Борисов, С.В. Чепур, В.В. Кацалуха, А.Е. Антушевич, Л.А. Кожемякин, Е.Л. Васюкова, И.Е. Мотушук, А.О. Новиченков // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2001. № 4. С. 32–38.

3. Колесов М.А. Некоторые данные о развитии окольного кровообращения после перевязки сонных артерий у белой крысы // Морфогенез и структура органов человека и животных. – Минск: «Беларусь». 1970. С. 179–183.
4. Макарова Л.М. Экспериментальная оценка эффективности глицина и его фосфорилированного производного при ишемических повреждениях головного мозга / Л.М. Макарова, В.Е. Погорелький // Экспер. и клин. фармакол. 2006. Т. 69. № 6. С. 24–26.
5. Саблина Е.В. Современная оценка терапии хронических гепатитов и неосложненных циррозов печени в фазе обострения: автореф. дисс. канд. мед. наук. / Е.В. Саблина / СПбГМУ им. И.П.Павлова. СПб. 1997. 20 с.
6. Яковлева Е.В. Исследование эффективности семакса при глобальной ишемии мозга *in vivo* / Е.В. Яковлева, В.С. Кузенков, В.Н. Федоров, В.И. Скворцова, В.Б. Кошелев, Е.И. Гусев, И.П. Ашмарин // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1999. Т. 128. № 8. С. 172–174.
7. Bacigaluppi M. Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia / M. Bacigaluppi, G. Comi, D.M. Hermann // Open Neurol. J. 2010. № 4. P. 34–38.
8. Liu R. Therapeutic effect of somatostatin on acute respiratory distress syndrome in experimental rats / R. Liu, C.H. Wang, M.H. Huang // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2006. Vol. 37. № 3. P. 412–415.
9. Prieto-Arribas R. Experimental models of cerebral ischemia / R. Prieto-Arribas, A. Moreno-Gutiérrez, P. Simal-Hernández, J.M. Pascual-Garvi, J. Matías-Guiu, J.M. Roda, J.A. Barcia-Albacar // Rev. Neurol. 2008. Vol. 47.

№ 8. P. 414-426.

10. *Tohda M.* Expression changes of the mRNA of Alzheimer's disease related factors in the permanent ischemic rat brain / M. Tohda, P. Suwanakitch, R. Jeenapongsa, H. Hayashi, H. Watanabe, K. Matsumoto // *Biol. Pharm. Bull.* 2004. № 12. P. 2021-2023.

11. *Ulrich P.T.* Laser-Doppler Scanning of Local Cerebral Blood Flow and Reserve Capacity and Testing of Motor and Memory Functions in a Chronic 2-Vessel Occlusion Model in Rats / P.T. Ulrich, S. Kroppenstedt, A. Heimann, O. Kempfski // *Stroke.* 1998. № 29. P. 2412-2420.

Features of experimental modelling of somatic and neurologic diseases for estimation of medical products efficiency

S.V. Chepur, V.N. Bykov, M.A. Yudin, A.S. Nikiforov, I.V. Fateyev, A.A. Arutyunyan

The evidence about liver lipid dystrophy, liver cirrhosis, pancreatitis with diabetes mellitus and demyelination nerve diseases experimental modeling are systemized. The experimental pathologies are induced by medicine and chemical substances application in optimal doses. Two step brain insult formation on rat is accomplish at common carotid arteria ligation with following contralateral arteria clamping after several time. Standardization and registration time optimization for medicine efficiency estimation are realized in morphological and biochemical testing which presented the identity of pathological changes in animal and human. During medicine screening the adequacy of experimental model is confirmed.

Key words: dimethylnitroamine, streptozocine, paraquate, organophosphates, reperfusion syndrome.



Анализ некоторых физиологических и этологических характеристик бесшёрстных крыс как новая модель биомедицинских исследований

Д.А. Беляев¹, М.М. Пекелис¹, Ю.В. Фокин², Л.Х. Казакова²

¹ – РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Беляев Дмитрий Анатольевич, d_belyaev@mail.ru

В статье анализируются возможные причины пониженной температуры тела и сравнительно низкого уровня метаболизма у бесшёрстных крыс по сравнению с крысами с нормальным волосным покровом и помесными крысами. Вероятно, у данных животных, лишённых волосного покрова, это связано с необходимостью снижения теплопотерь, что заставляет их меньше двигаться и чаще умыться, чтобы согреться. Указанные факты делают этих животных привлекательными в качестве моделей для различного рода биомедицинских исследований.

Ключевые слова: бесшёрстные крысы, терморегуляция, температура тела, скорость прохождения пищи по ЖКТ, двигательная активность, ультразвуковая вокализация, биомедицинские и доклинические исследования.

Введение

Многие метаболические реакции у гомойотермных животных могут протекать в узких температурных рамках. В связи с необходимостью нормального процесса метаболизма, в живом организме поддерживается относительно постоянная температура тела [7]. Для этого должно выполняться одно требование: скорость теплопотерь должна быть равна скорости теплопродукции. За температуру тела млекопитающего обычно принимается температура тела глубоко расположенных органов, называемая внутренней температурой (core temperature), измеряется она ректально [13]. Внутренняя температура подверже-

на некоторым колебаниям – например, суточным. У ночных животных, к которым относятся крысы, она на 1-2° выше в тёмное время [12]. В светлое время суток она равняется 37,3°С [16]. Кроме того, на характер терморегуляции у крыс оказывают влияние режим питания, лучистая УФ-радиация, температурные особенности внешней среды, сезонные изменения физиологических функций [11], а также мышечная нагрузка, зрелость животного, возраст и т.д., при этом постоянной корреляции между размерами и температурой тела не наблюдается [9]. В целом, грызунам присуще снижение роли химической терморегуляции, характерной для низших млекопитающих, при этом

они представляют промежуточное звено со слабо развитой физической терморегуляцией (слабый механизм сосудистой регуляции, имеются зачатки потоотделения). Таким образом, терморегуляция у лабораторных крыс имеет широкий спектр вариаций, их температура тела отличается малой устойчивостью и довольно сильно зависит от температуры окружающей среды. В литературных источниках также содержатся достаточно противоречивые данные относительно ректальной температуры тела крыс: 34,4°C [11], 36,6-37,9°C [16], 37,5-39,2°C [4], 38-39°C [17], 38,1°C [9], 38,5-39,5°C [5], а в целом, крысы способны пережить колебания температуры тела в пределах от 18°C до 41°C [18]. Оптимальной для содержания лабораторных крыс считается температура воздуха 20-26°C [3, 9].

Важную роль в поддержании постоянной температуры тела у млекопитающих играет шерстный покров. Воздух, находящийся между волосками, создаёт буферную зону между кожей и окружающей средой, препятствуя теплопотерям. Животные, обитающие в холодном климате, имеют густой шерстный покров с подшерстком. Когда в результате мутации животные теряют шерстный покров, возникает необходимость поддержания температуры тела за счёт других ресурсов организма [7, 8].

Материалы и методы

Эксперимент проводился в осенние периоды 2009 и 2011 гг. на базе кафедры зоологии РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева и ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН.

В исследованиях принимали участие три группы крыс, уравненных по массе, в возрасте 24-х недель: группа 1 (контрольная) – нелинейные крысы с нормально

развитым шерстным покровом (n=30), группа 2 – бесшерстные крысы аутбредной популяции, полученные в результате спонтанной мутации (n=41), и группа 3 – гибриды F1 между крысами из групп 1 и 2 с промежуточным состоянием шерстного покрова (n=26). Крысы находились в одинаковых условиях содержания и кормления. Содержались в клетках типа Т-3 при световом цикле 12:12, получали комбикорм для хомяков, крыс и мышей производства ООО «Лабораторкорм». Вода была в свободном доступе. Температура в помещении составляла 15-18°C. Температуру тела измеряли ректально электронным термометром с точностью измерения 0,1°C.

При изучении скорости прохождения пищи по ЖКТ использовалась методика В.Ю. Литвина и И.Л. Кулика [6], несколько модифицированная нами. Для этого также были сформированы три группы животных, аналогичных предыдущим, по 11 особей в каждой. Животные помещались в небольшие индивидуальные клетки с поддоном для сбора фекалий. За сутки до начала эксперимента крыс прекращали кормить, затем каждой давали кусочек хлеба, пропитанного 0,2 мл эозина. Далее каждый час контролировали состояние животных, убирая найденные экскременты и фиксируя время появления первых фекалий, окрашенных эозином.

Дополнительно анализировались поведенческие и коммуникативные особенности данных животных.

В эксперименте принимали участие животные обоих полов популяции бесшерстных крыс в сравнении с крысами с нормальным шерстным покровом линии WAG/GY, по 9 особей в каждой группе. Возраст животных: 4-5 мес., масса – 300-450 г.

Регистрация УЗВ. Коммуникативные особенности животных в виде их вокализации в ультразвуковом диапазоне фиксировались [10] с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack (Metris B.V., Нидерланды). Микрофоны устанавливались дистантно, на расстоянии 20-25 см от головы животных. Частота дискретизации составляла 200 кГц, сигнал записывался в цифровом формате. Регистрация ультразвуковых колебаний (в течение 30 мин.) у каждого животного проводилась в состоянии спокойного бодрствования, в одно и то же время суток (13.00-17.00 местного времени). Всего было произведено 5 замеров. После удаления физических артефактов (монотонных шумов) осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 15 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB методом Уэлча. Эпоха анализа составляла 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье – 2000 интервалов. В ходе анализа спектральную плотность мощности ультразвука (СПМ), излучаемого каждым животным, нормировали к СПМ фона окружающей среды, в результате получали вектор-строку изменений ультразвука, в котором находили максимум, приравнявая его к 100%, остальные значения изменяли пропорционально максимуму. После этого находили медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного и по группам.

Регистрация поведенческих компонентов происходила одновременно с исследованием УЗВ, в те же временные промежутки. Для этого использовалась система Laboras (Metris B.V., Нидерланды), которая позволяла вычислять дли-

тельность таких форм поведения как локомоции (горизонтальная активность), неподвижность, стойки (вертикальная активность), умывание [10]. Кроме того, оценивалось время так называемых нераспознанных системой движений. По каждому животному определяли процент каждой формы поведения от общей длительности эксперимента, после чего полученные данные (по всем пяти замерам) группировали в зависимости от формы поведения, находя среднеарифметическое значение. В результате длительность каждой формы поведения (в процентах) бесшерстных крыс сравнивалась с аналогичным показателем в группе крыс с нормальным шерстным покровом.

Результаты и их обсуждение

Измерение температуры тела.

Измеряя температуру тела крыс с различным шерстным покровом, мы получили следующие данные. Температура тела крыс с нормальным шерстным покровом была самой высокой среди исследованных групп крыс (35,9±0,23°C), несколько ниже – у гибридов (35,3±0,18°C), самые низкие показатели отмечались у бесшерстных крыс (34,3±0,12°C).

Прохождение пищи по ЖКТ.

По результатам наших исследований, наибольшая скорость прохождения пищи по ЖКТ наблюдалась у гибридов (группа 3), наименьшая – у бесшерстных крыс (группа 2). При этом различия между группами помесных и бесшерстных крыс оказались достоверными ($P \leq 0,005$, $n=22$) Различия между крысами с нормальным шерстным покровом (группа 1) и бесшерстными крысами недостоверны (рис. 1).

Итак, в нашем исследовании наименьшая температура тела была зафиксирована у бесшерстных крыс. Этот результат в некоторой степени согласуется с

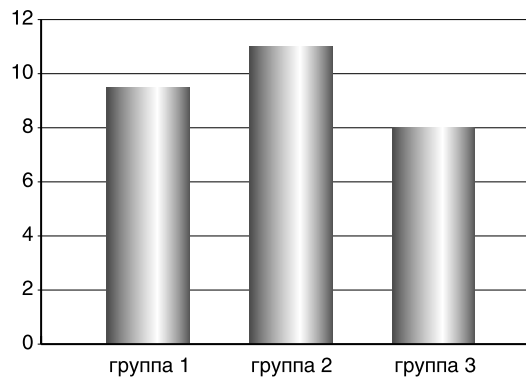


Рис. 1. Время прохождения пищи по желудочно-кишечному тракту.

данными, полученными на других видах бесшёрстных животных. Аналогичная картина наблюдалась, например, у бесшёрстных мышей [15]. А у бесшёрстных кошек ректальная температура достоверно не отличалась от таковой короткошёрстных кошек, а температура кожи была выше [2]. Однако следует отметить, что хищникам характерна совершенно иная терморегуляция, и они меньше зависят от температуры окружающей среды. Низкую внутреннюю температуру тела бесшёрстных крыс можно объяснить следующим. Для поддержания постоянной температуры тела необходимо, чтобы метаболическая теплота равнялась теплопотерям. То есть скорость потери тепла (H) пропорциональна разности температур тела (T_T) и окружающей среды (T_C):

$$H = C(T_T - T_C),$$

где C – коэффициент, зависящий от массы тела и удельной теплопроводности тканей [13]. Соответственно, чем больше разность в правой части уравнения, тем больше теплопотери. Таким образом, одним из путей уменьшения теплопотерь может быть сокращение разности температур между организмом и средой. Мелкие млекопитающие не могут при низкой температуре среды удержать высокую разность температур тела и окружающей

среды. Не имея возможности повлиять на температуру среды, они могут понизить собственную температуру тела. Уменьшение разности температур понижает процесс теплоотдачи. У крыс при колебаниях температуры окружающей среды от 15 до 30°C температура тела варьировала в пределах 33,0-37,2°C [11]. Но существенное значение здесь имеет шёрстный покров. При охлаждении лабораторной крысы с довольно густым шёрстным покровом понижение её температуры тела начиналось при температуре воздуха -25°C, а у морской свинки с редким шёрстным покровом – уже при -15°C. Термоизоляция шёрстного покрова крыс летом равна 0,079 мкал/см³·сек·град, а зимой – 0,091 мкал/см³·сек·град. Толщина кожи также влияет на теплоизоляционные свойства шкурки. Способность к потоотделению у грызунов развита довольно слабо. Как показали наши исследования [1], бесшёрстные крысы вообще лишены потовых желёз. Кожный покров у них тоньше, чем у крыс с нормальным шёрстным покровом, а слой эпидермиса – несколько толще. Вероятно, по своим способностям к терморегуляции они довольно близки к африканским голым землекопам (*Heterocephalus glaber* Rüppel, 1842), которые также весьма зависимы от температуры окружающей среды [14].

Поскольку в течение эксперимента животные содержались при температуре воздуха ниже комфортной, им приходилось уменьшать разность температур тела и окружающей среды за счёт понижения температуры тела. Однако понижение температуры тела у бесшёрстных крыс не вышло за пределы физиологической нормы крыс, указанной А.Ф. Слонимом [11]. Крысы с нормальным шёрстным покровом имели возможность за счёт его термоизолирующих свойств и более толстой кожи не понижать так сильно свою температуру тела. Бесшёрстным же крысам, которые лишены этого фактора, влияющего на терморегуляцию, пришлось приспосабливаться к температуре окружающей среды. Меньшая способность поддерживать постоянную температуру тела делает их крайне зависимыми от температуры окружающей среды. Кроме того, у них может быть понижена так называемая «контрольная точка» (set point) [16, 18], то есть та температура, которую животное поддерживает, чтобы как можно больше уравновесить теплопродукцию и теплопотери, как, например, это происходит у бесшёрстных мышей. Считается, что у них эта «контрольная точка» ниже, чем у мышей с нормальным шёрстным покровом, и поэтому они обладают более низкими энергетическими потребностями для терморегуляции, что, в свою очередь, компенсирует их плохую термоизоляцию [15]. Вероятно, это обстоятельство справедливо и для бесшёрстных крыс.

Чем выше интенсивность обменных процессов у мелких млекопитающих, тем больше их потребности в пище. Количество потребляемой пищи и энергетические потребности – тесно взаимосвязаны. Для того, чтобы иметь возможность потреблять большее количество пищи,

необходимо, чтобы скорость её прохождения по ЖКТ была выше. Высокая скорость прохождения корма через пищеварительный тракт у грызунов не сказывается на усвояемости питательных веществ [7, 8]. Диктуемые скоростью обменных процессов кормовые потребности, а также и периодическая деятельность пищеварительного аппарата в значительной степени есть функция терморегуляции. Поскольку, как мы убедились, бесшёрстным крысам приходится снижать температуру тела, чтобы уменьшить теплопотери, то снижается и уровень метаболической теплоты, а также замедляется скорость прохождения пищи по ЖКТ.

Ультразвуковая вокализация и коммуникативные особенности.

Результаты исследований УЗВ животных представлены на рис. 2.

Как видно из рисунка, частотные составляющие двух кривых в диапазоне 15-47 кГц буквально в точности аналогичны друг другу, что говорит о схожести коммуникативных особенностей данных групп животных. В области 50-100 кГц УЗВ бесшёрстных крыс более «скачкообразна» по сравнению с крысами с нормальным шёрстным покровом, что проявляется в периодических пиках небольшой мощности, имеющих, вероятно, свои информативные признаки. В целом, основным отличием УЗВ бесшёрстных крыс от крыс с нормальным шёрстным покровом является наибольшая мощность писка, которая, по-видимому, связана с остротой слуха данных животных, сниженной в результате мутаций.

Поведенческие особенности.

Результаты проведённых этологических исследований представлены в таблице.

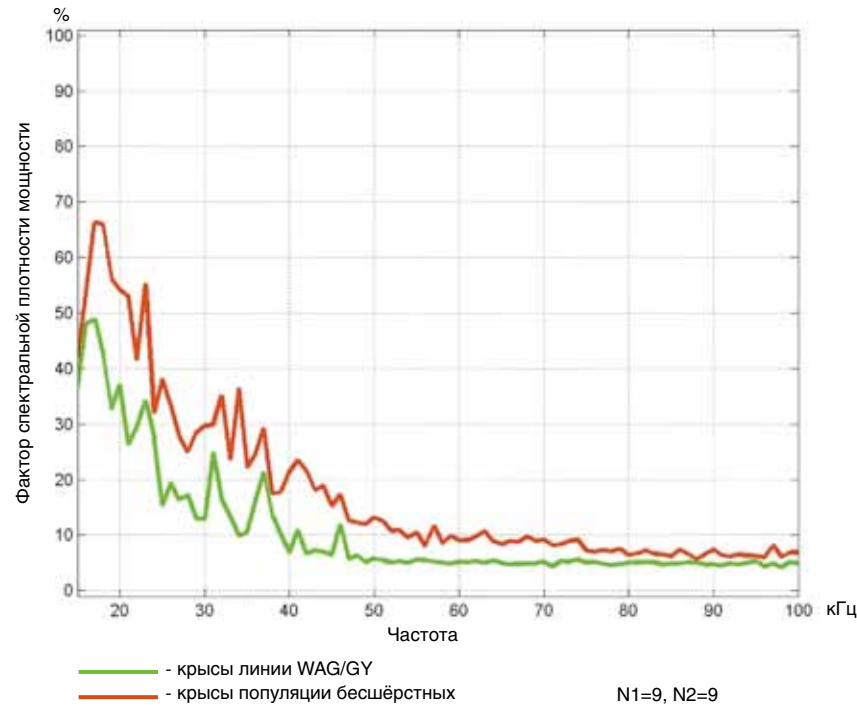


Рис. 2. Сравнительный анализ УЗВ крыс с нормальным волосным покровом и бесшёрстных крыс аутбредной популяции.

Как видно из таблицы, в группе бесшёрстных крыс существенно снижена вертикальная активность, они более неподвижны по сравнению с крысами с нормальным шёрстным покровом. Однако длительность умыывания бесшёрстных крыс почти на треть превышает данный показатель в группе крыс с нормальным шёрстным покровом. Данный результат, скорее всего, связан с пониженной температурой бесшёрстных крыс. Т.е., чтобы уменьшить теплопотери и согреться, они меньше двигаются и чаще умыываются.

Таким образом, бесшёрстных крыс можно рассматривать как биомодель для изучения интенсивности обмена веществ. Также бесшёрстные животные являются признанным объектом для дерматологических исследований. Ранее проведённые исследования [1] показали, что бесшёрстные крысы могут быть интересны

для доклинических исследований ряда гормональных препаратов. А анализируя поведенческие особенности данных животных, можно предположить, что они могут использоваться и в качестве моделей для биомедицинских исследований, проводимых в искусственно создаваемых жёстких условиях окружающей среды.

Выводы

При существенном понижении температуры окружающей среды организм крыс не в состоянии компенсировать потери температуры тела, и она может опускаться до нижнего порога физиологической нормы – причём у бесшёрстных крыс в большей степени, чем у крыс с нормальным шёрстным покровом и гибридов. Также у бесшёрстных крыс замедляется прохождение пищи по желудочно-кишечному тракту, снижается

Сравнительный анализ поведенческих особенностей крыс с нормальным шёрстным покровом и бесшёрстных крыс аутбредной популяции

Форма поведения	Длительность компонента (% от общего времени эксперимента)	
	Крысы с нормальным шёрстным покровом	Бесшёрстные крысы аутбредной популяции
Неподвижность	33,5	34,8
Горизонтальная активность	2,3	2,4
Вертикальная активность	14,3	7,2
Умыывание	21,3	28,0
Нераспознанные движения	28,6	27,6

двигательная активность, что способствует экономному расходованию энергии и уменьшению теплопотерь. В связи с этим, бесшёрстных крыс рекомендуется содержать при более высокой температуре.

Данные животные привлекательны для различного рода опытов, направленных на изучение влияния веществ, изменяющих метаболизм, гормональных и дерматологических препаратов, а также для других видов биомедицинских и доклинических исследований.

Список литературы

1. **Блохин Г.И., Беляев Д.А., Пекелис М.М., Губская Е.М., Казакова Л.Х.** Особенности гистологического строения кожных покровов и молочной железы бесшёрстных крыс // Биомедицина. 2011. № 3. С. 50-53.
2. **Блохина Т.В.** Морфо-функциональные особенности кошек породы донской сфинкс: Дис. ... канд. биол. наук. М. 2005. 127 с.
3. **Каркищенко Н.Н.** Основы биомоделирования. М.: Изд-во ВПК. 2004. 608 с.
4. Лабораторная крыса (Справочный материал) / Ланг С.М., Уилсон Р.П. // Лабораторные животные. 1993 т. III. № 2. С.111-120.
5. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / Западнюк И.П., Заниднюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. – Киев: Вища школа. Головное изд-во. 1983. 383 с.
6. **Литвин В.Ю., Кулик И.Л.** Поиски красителей, выводящихся из организма с фекалиями, для мечения мышей и полевок // Зоол. журнал. – 1969. т. XLVIII, вып. 6. С. 920-923.
7. **Пантелеев П.А.** Биоэнергетика мелких млекопитающих. Адаптация грызунов и насекомых к температурным условиям среды. М.: Наука. 1983. 269 с.
8. **Пантелеев П.А.** Родентология. – М.: Т-во научных изданий КМК, 2010. 221 с.
9. **Проссер Л., Браун Ф.** Сравнительная физиология животных. –М.: Мир. 1967. 675 с.
10. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям

- в биомедицинских технологиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010. 358 с.
11. **Слоним А.Ф.** Животная теплота и ее регуляция в организме млекопитающих. – М.-Л.: Изд. АН СССР. 1952. 325 с.
12. **Шмидт-Нюельсен К.** Физиология животных. Приспособление и среда. В 2 томах (т.1). М.: Мир. 1982. 412 с.
13. **Шмидт-Нюельсен К.** Размеры животных: почему они так важны? М.: Мир. 1987. 259 с.
14. **Daly T.J.M., Buffenstein R.** Skin morphology and its role in thermoregulation in mole-rats, *Heterocephalus glaber* and *Cryptomys hottentotus* // J. Anat. 1998. No. 193. P. 495-502.
15. **Donnelly H.T.** Oxygen consumption, activity and body fat in normal and hairless mice // *Laboratory Animals*. 1982. No.16. P.167-171.
16. **Gordon C. J.** Temperature regulation in laboratory rodents. N-Y.: Cambridge University Press. 1993. 276 p.
17. **Pass D., Freeth G.** The Rat // *ANZCCART News*. 1993 Vol. 6 No 4. P. 1-4.
18. **Satinoff E.** Thermoregulation // I.Q. Whishalow, B. Kolb (Eds.) *The behavior of the laboratory rat. A handbook with tests*. NY.: Oxford University Press. 2005. P. 226-236.

The analysis of some physiological and ethological characteristics of hairless rats as new model of biomedical researches

D.A. Belyaev, M.M. Pekelis, Yu.V. Fokin, L.Kh. Kazakova

In article the possible reasons of the lowered body temperature and rather low level metabolism of hairless rats in comparison with rats with a normal hair coat and hybrid rats are analyzed. Possibly, at the given animals deprived of a hair coat, it is connected with necessity of decrease of heat losses that forces them to move less and more often to wash to be warmed. The specified facts do these animals attractive as models for any biomedical researches.

Key words: hairless rats, thermoregulation, body temperature, rate of passage of food through the digestive tract, impellent activity, ultrasonic vocalization, biomedical and non-clinical researches.

Радиационно-индуцированные повреждения коллагена в сухожилиях *in vitro*

Н.Ю. Игнатьева¹, О.Л. Захаркина², М.В. Кочуева³, А.В. Масленникова^{3,4}, В.А. Каменский⁴, В.Н. Баграташвили²

¹ – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

² – Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Троицк

³ – Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

⁴ – Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

Контактная информация: профессор Виктор Николаевич Баграташвили bagrat@laser.ru

В работе изучен эффект ионизирующего излучения аппарата для дистанционной лучевой терапии «Луч-1» (энергия пучка 1,25 МэВ, однократная доза 10 Гр) на коллаген сухожилий хвостов крыс. Уменьшение энthalпии денатурации коллагена и устойчивости к действию протеолитического фермента (трипсина) указывает на частичную деградацию макромолекул коллагена (19±7%). Появление после облучения дестабилизированной фракции макромолекул коллагена и изменение их взаимодействия с водой обнаружено с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, сухожилие хвоста крысы, коллаген, многофотонная микроскопия.

Одним из первых этапов изучения динамики радиационно-индуцированной деградации тканей является определение модификации коллагенового каркаса при воздействии ионизирующего излучения. В литературных данных описываются, главным образом, изменения коллагена при облучениях дозами ≥ 10 кГр, которые проводятся для стерилизации коллагенсодержащих материалов. Они на несколько порядков превышают дозы, используемые в клинике при проведении лучевой терапии, и вызывают глубокие повреждения на всех уровнях структурной иерархии коллагена – от молекул до общей архитектоники материала [8, 12, 13, 16]. Целью настоящей работы явилось выявление первичных радиационно-индуцированных изменений в коллагеновой сетке *in vitro* при воздействии ионизирующего излучения в дозе, вызывающей начальные визуально определяемые изменения

тканей. В качестве объекта исследования использовали сухожилия хвостов крыс с квазикристаллической одноосной укладкой молекул в фибриллы, фибрилл — в волокна, а волокон — в пучки [3, 4].

Материалы и методы

Отсеченные хвосты (n=3) белых беспородных крыс подвергали облучению с помощью аппарата для дистанционной лучевой терапии «Луч-1» (энергия пучка 1,25 МэВ) однократно в дозе 10 Гр, что соответствует 30 Гр в режиме стандартного фракционирования. Далее сухожилие препарировали и исследовали методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии (КП ОКТ) по всей длине. Затем сухожилие освобождали от мышечной ткани, отмывали в 0,15 М растворе NaCl и выделяли пучки коллагена. Образцы сухожилия для изучения методом многофотонной микроскопии фиксировали.

сировали в 4% растворе формальдегида. Образцы для термического анализа хранили при -20°C , непосредственно перед анализом изымали и выдерживали в 0,15 М растворе NaCl в течение 1 ч при комнатной температуре. Образцы для определения протеолитической устойчивости к трипсину высушивали на воздухе в течение 24 ч, а для определения сорбционной емкости воды высушивали в вакууме при 50°C в течение 24 ч.

Термическое поведение коллагена в образцах изучали с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) (DSC TA 4000, ячейка DSC30, METTLER, Швейцария). Образцы массой 10-20 мг герметично закрывали в стандартных алюминиевых чашках и нагревали от 5 до 100°C со скоростью 10 К/мин. После проведения термического анализа образцы лиофильно высушивали и взвешивали. О степени деградации макромолекул судили по уменьшению теплового эффекта денатурации ΔH в облученных образцах по сравнению с энтальпией денатурации коллагена в intactных образцах сухожилий ΔH_d .

В качестве количественной характеристики протеолитической устойчивости использовали снижение массы образца после его инкубации в растворе трипсина (1 мг/мл, отношение фермент: субстрат 1:10) с добавлением азида натрия (0,02%) и ЭДТА (0,025 М) в течение 24-х ч при 37°C .

Сорбционные свойства образцов определяли гравиметрически после набухания высушенных препаратов в 0,15 М растворе NaCl с добавлением азида натрия (0,02%) в течение 6 ч при 37°C . Образцы промокали фильтровальной бумагой и взвешивали с точностью до 0,00001 г. Содержание воды выражали в процентах по отношению к массе высушенного препарата ткани.

Для получения микрофотографий с визуализацией волокон и пучков коллагена была использована многофотонная микроскопия с регистрацией сигнала второй гармоники. Нелинейный сигнал генерации второй гармоники (ГВГ), возникающий от макромолекул коллагена с отличной от нуля нелинейной поляризуемостью [11], имел высокую интенсивность, что обусловлено плотной параллельной упаковкой хромофоров [6]. Исследования проводились на микроскопе LSM Meta (Karl Zeiss, Germany). Возбуждение осуществлялось импульсным (100 фс) излучением лазера (MaiTai HP, Spectra Physics, США) на длине волны 800 нм с частотой повторения импульсов 80 МГц. Изображение среза, содержащее 1024×1024 пикселя, получали с увеличениями $\times 10$, $\times 20$ и $\times 40$. Пучки коллагена диаметром ~ 400 мкм перед съемкой выделялись из препаратов ткани и помещались между покровными стеклами для предотвращения высыхания. Основы метода и особенности его применения для получения ГВГ изображений коллагенсодержащих тканей подробно описаны в работах [7, 11].

Для проведения исследований методом КП ОКТ был использован компактный волоконно-оптический поляризационно-чувствительный томограф, разработанный в Институте Прикладной Физики РАН (Н. Новгород, Россия). Прибор оснащен гибким волоконно-оптическим зондом, источником излучения является суперлюминесцентный диод ($\lambda=980$ нм). Разрешение системы в аксиальном направлении составляет 10 мкм, в латеральном – 25 мкм. Количественную характеристику анизотропной среды – двулучепреломление (Δn) – рассчитывали по периоду модуляции интенсивности интерференционного обратно рассеянного сигнала (z_b): $\Delta n = \lambda / (2z_b)$. Основы ме-

тода и особенности его применения для получения КП ОКТ-изображений (томограмм) коллагенсодержащих тканей подробно описаны в работах [1, 2].

Результаты и их обсуждение

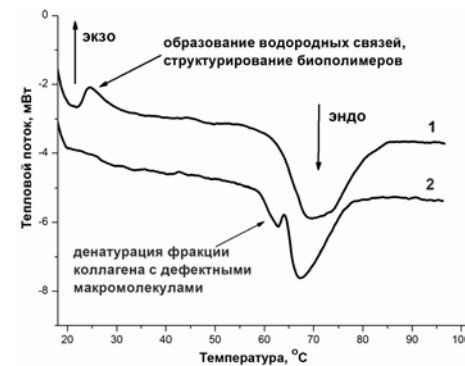


Рис. 1. Типичные термограммы intactных (1) и облученных (2) секвестрированных образцов сухожилий хвостов крысы.

При нагревании образцов intactных сухожилий в ДСК калориметре от 5 до 100°C на термограммах проявляются два пика (рис. 1, кривая 1). Первый пик с максимумом 25°C ($29,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$) соответствует экзотермическому процессу с $\Delta H = - (5 \pm 1)$ Дж/г сухого препарата ткани, а второй пик с максимумом $66,7 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ – эндотермическому процессу с $\Delta H = 42,2 \pm 0,9$ Дж/г, сухого препарата ткани ($n=7$). Характеристики эндотермического перехода соответствуют денатурации коллагена (ΔH_d и T_d [11, 12]). Дополнительным доказательством того, что на ДСК термограммах при $66,7 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ регистрируется именно переход спираль-клубок, является растворимость в трипсине (ферменте, который является катализатором протеолиза поврежденных макромолекул коллагена, в то время как intactные трехспиральные молекулы устойчивы к воздействию сериновых протеаз [14]) образцов, изъятых

из калориметра после прогрева до 80°C . Прогрев до 63°C не приводил к потере массы препаратов в растворе трипсина. Наличие экзотермического перехода при 25°C при нагреве коллагенсодержащих тканей отмечалось в работе [10]. Там же было высказано предположение, что эффект связан с образованием водородных связей между полярными группами коллагена и молекулами воды или через водно-мостиговые связи и приводит к упорядочиванию системы биополимер-вода.

После ионизирующего воздействия ДСК кривые препаратов сухожилий значительно изменялись. На эндотерме денатурации проявлялся низкотемпературный пик, энтальпия денатурации снижалась до $33,5 \pm 5,5$ Дж/г ($n=5$), а экзотермический эффект на термограммах исчезал (рис. 1, кривая 2).

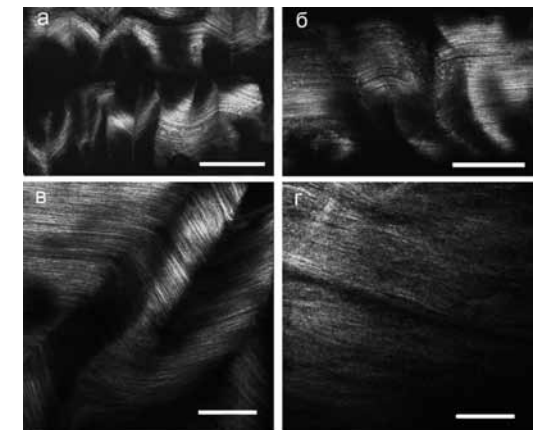


Рис. 2. ГВГ изображения ткани сухожилий до (а, в) и после (б, г) ионизирующего воздействия. Бар 200 мкм (а, б) и 50 мкм (в, г).

На облученных препаратах регистрировалось снижение массы в растворе трипсина на $19 \pm 7\%$ ($n=9$) по сравнению с intactными образцами, уменьшение массы которых за счет протеолиза неколлагеновых белков составляло $6 \pm 2\%$ ($n=9$). Способность набухать в воде так-

же возрастала у высушенных облученных препаратов ($264 \pm 27\%$, $n=6$ против $223 \pm 21\%$, $n=9$, отличие статистически значимо, $p < 0,5$).

Ионизирующее воздействие приводило лишь к незначительным изменениям в упаковке коллагеновых волокон матрикса ткани (рис. 2), причем оно наблюдалось лишь при увеличении $\times 20$ и выше. На ГВГ изображениях интактных образцов ярко проявлялись морфологические особенности сухожильной ткани, где волокна параллельно уложены во вторичные, а затем и третичные пучки, причем последние демонстрируют характерные для сухожильной ткани складчатости (кримпы). В облученных препаратах волокнистая структура в целом сохранялась, хотя границы между вторичными и третичными пучками становились несколько смазанными и отмечались локальные разрыхления волокон (рис. 2 г).

Интерференционная картина на КПОКТ томограммах (рис. 3), обусловленная параллельной укладкой макромолекул, фибрилл и волокон в сухожилии, практически не изменялась после ионизирующего облучения. Анизотропные свойства сохранялись, и двулучепреломление в облученной и контрольной ткани составляло $\Delta n \approx 7 \times 10^{-3}$.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в коллагеновой сети первичным откликом на ионизированное излучение явилось повреждение макромолекул коллагена. У части макромолекул нативная трехспиральная конформация претерпела деградацию. Термический анализ показал, что доля таких молекул составляла $\sim 19\%$ (именно на столько уменьшается ΔH_d в облученных образцах), что хорошо согласуется с данным по протеолитической устойчивости.

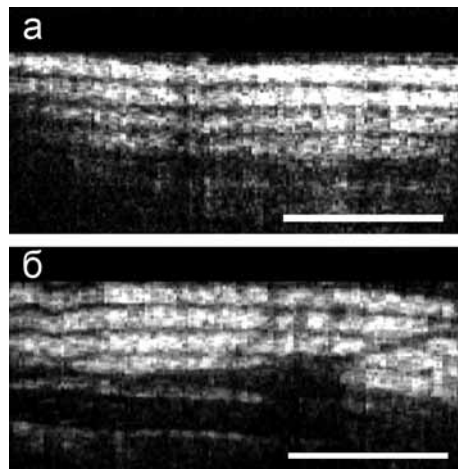


Рис. 3. КПОКТ томограммы интактной (а) и облученной (б) ткани сухожилия. Бар 500 мкм.

Обращает на себя внимание появление фракции коллагена с более низкой температурой денатурации, чем T_d коллагена в интактных сухожилиях. При высоких дозах радиации (от 1,9 кГр и выше) в облученных материалах происходит общее снижение T_d на 15°C и более [16]. В работах [13, 16] показано, что ионизирующее облучение при высоких дозах инициирует разрывы полипептидных цепей коллагена с последующей фрагментацией волокнистой структуры материала. В результате увеличивается свободный объем для денатурирующих цепей и ΔS денатурации, вследствие этого T_d уменьшается. Изменение волокнистой структуры, которое можно характеризовать как разрыхление, носило локальный характер (рис. 2б). Возможно, именно в областях разрыхления денатурация коллагена начинается при более низкой температуре, и само наличие таких областей обуславливает повышенную набухаемость облученных образцов.

Мы полагаем, что при относительно низких дозах воздействия (< 30 Гр) частичная дестабилизация коллагена связана с редкими разрывами отдельных пептидных связей в макромолекулах, при

этом полипептидные цепи не расходятся из-за наличия поперечных сшивок. Такое явление отмечалось, в частности, после кратковременного (30-900 с) УФ облучения раствора коллагена I ($\lambda=253,7$ нм) [9], а также в суставной капсуле после электротермического воздействия [5]. Доказано, что фракция коллагена с пониженной T_d характеризуется трехспиральной конформацией, хотя и менее стабильной, чем интактные молекулы [9]. Лишь при длительном (1 ч и более) УФ облучении ($\lambda=302$ нм) соединительных тканей [14, 15] отмечалось устойчивое снижение максимума пика эндотермы денатурации на $10-20^\circ\text{C}$ при одновременном уменьшении ΔH_d . Таким образом, пролонгированное воздействие приводит к серьезным повреждениям первичной структуры белка, и, как следствие, к деструкции ее трехспиральной конформации. По-видимому, механизмы воздействия на коллаген УФ и более жесткого гамма-излучения схожи, и на начальной стадии лишь часть макромолекул оказывается деградированной. Нарушения первичной и третичной структуры белка приводили к изменению взаимодействия биополимера с растворителем – водой, что проявлялось в исчезновении экзотермического эффекта образования структурирующих водородных связей при 25°C .

Выводы

При действии ионизирующего излучения в относительно низких дозах первичным откликом в коллагеновой сети *in vitro* является частичная потеря и дестабилизация нативной трехспиральной конформации. Изменение же волокнистых структур является, по-видимому, вторичным по отношению к изменению белка на молекулярном уровне. Модификация матрикса соединительной тка-

ни *in vivo* протекает по более сложному механизму и включает стадии изменения коллагена с участием активных форм кислорода. Тем не менее, определенный в нашей работе первичный отклик каркаса матрикса важен для анализа последующих деградации и репарации ткани.

Список литературы

1. **Гладкова Н.Д., Шахова Н.М., Сергеев А.М.** Руководство по оптической когерентной томографии. М.: ФИЗМАТЛИТ. 2007. 296 с.
2. **Логунова М.А., Шахова М.А., Андреева И.В., Игнатъева Н.Ю., Каменский В.А., Баграташвили В.Н.** Эффект уменьшения термостабильности коллагена при нарушении целостности ткани щитовидного хряща гортани // Биофизика. 2008. т. 53. № 5. С. 202-210.
3. **Николаева Т.И., Тиктопуло Е.Е., Ильясова Е.Н., Кузнецова С.М.** Структурно-термодинамические аспекты упаковки коллагеновых фибрилл // Биофизика. 2007. т. 52. № 5. С. 899-911.
4. **Церетели Г.И.** Тепловая денатурация коллагена в растворе и фибриллах // Биофизика. 1982. т. 27. № 5. С. 780-784.
5. **Bognar G., Szabo I., Balint L., Hepp B., Kereskai L., Lorinczy D.** Thermal effects of shoulder electrothermal arthroscopic capsulorrhaphy monitored by differential scanning calorimetry - A preliminary study // Thermochemica Acta. 2007. v. 464. № 1-2. P. 78-82.
6. **Deniset-Besseau A., Duboisset J., Benichou E., Hache F., Brevet P.F., Schanne-Klein M.-C.** Measurement of the second-order hyperpolarizability of the collagen triple helix and determination of its physical origin //

- J. Phys. Chem. B. 2009. v. 113. № 40. P. 13437-13445.
7. **Friedl P., Wolf K., von Andrian U.H., Harms G.** Biological second and third harmonic generation microscopy // *Curr. Protoc. Cell Biol.*, Chapter 4, unit 4.15. 2007.
 8. **Gouk S.S., Lim T.M., Teoh S.H., Sun W.Q.** Alterations of human acellular tissue matrix by gamma irradiation: histology, biomechanical property, stability, in vitro cell repopulation, and remodeling // *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2008. v. 84B. P. 205–217.
 9. **Miles C.A., Siokowska A., Hullin S.L., Sims T. J., Avery N.C., Bailey A.J.** Identification of an intermediate state in the helix-coil degradation of collagen by ultraviolet light // *J. Biol. Chem.* 2000. v. 275. № 42. P. 33014–33020.
 10. **Miles C.A., Wardale R.J., Birch H.L., Bailey A.J.** Differential scanning calorimetric studies of superficial digital flexor tendon degeneration in the horse // *Equine Vet. J.* 1994. v. 26. № 4. P. 291–296.
 11. **Roth S., Freund I.** Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon // *Biopolymers.* 1981. v. 20. № 6. 1271 p.
 12. **Seto A., Gatt Jr C.J., Dunn M.G.** Radioprotection of tendon tissue via crosslinking and free radical scavenging // *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2008. v. 466. P. 1788–1795.
 13. **Shah N.B., Wolkers W.F., Morrissey M., Sun W.Q., Bischof J.C.** Fourier transform infrared spectroscopy investigation of native tissue matrix modifications using a gamma irradiation process // *Tissue Engineering Part C: Methods.* 2009. v. 15. № 1. P. 33–40.
 14. **Sionkowska A.** Thermal stability of UV-irradiated collagen in bovine lens capsules and in bovine cornea. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2005. v. 80. № 2. P. 87–92.
 15. **Sionkowska A.** Thermal denaturation of UV-irradiated wet rat tail tendon collagen // *Int. J. Biol. Macromol.* 2005. v. 35. P. 145–149.
 16. **Sun W.Q., Leung P.** Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation // *Acta Biomaterialia*, 2008. v. 4. № 4. P. 817–826.

The effects of gamma irradiation on the collagen in rat tail tendon *in vitro*

N.Yu. Ignatieva, O.L. Zakharkina, M.V. Kochueva, A.V. Maslennikova, V.A. Kamensky, V.N. Bagratashvili

The effect of gamma irradiation therapy on the collagen structure of rat tail tendon has been studied. The decrease in the denaturation enthalpy and increase in trypsin susceptibility was related with a damage of triple helical macromolecules (19±7%). Destabilized collagen fraction and the alteration in biopolymers-water interaction were observed by differential scanning calorimetry. The loosening of secondary and tertiary fiber bundles was revealed by second harmonic generation microscopy. No significant degradation of anisotropic properties and tissue architectonics was revealed by cross-polarization optical coherent tomography technique. The instant response of collagen matrix on ionized radiation is related to degradation of collagen at the molecular level of organization.

Key words: ionized radiation, rat tail tendon, collagen, second harmonic generation microscopy.

Исследование антибиотикорезистентности микроорганизмов электрохимическими методами

Я.М. Чаленко¹, В.В. Шумянцева¹, С.А. Ермолаева², А.И. Арчаков¹

¹ – НИИ биомедицинской химии В.Н. Ореховича РАМН, Москва

² – НИИ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва

Контактная информация: yaroslavazaka@yandex.ru

Разработан электрохимический метод анализа клеток *E.coli JM109* с помощью циклической вольтамперометрии и квадратно-волновой вольтамперометрии. На основе электроактивности бактериальных клеток предложена система для определения чувствительности микробиологического материала к антибиотикам. Электрохимический метод позволяет получать данные по антибиотикорезистентности клеток *E.coli JM109* в течение 2–5 часов.

Ключевые слова: *E.coli JM109*, электрохимия, антибиотикорезистентность.

Инфекционные заболевания являются серьезной проблемой здравоохранения [1]. По данным федеральной службы государственной статистики в России за 2010 г. на 1000 человек приходится 34,6 случаев инфекционных (бактериальных и некоторых паразитарных) заболеваний [2]. Пищевые отравления и загрязнение воды, внутрибольничные инфекции и пандемии, инфекционные агенты вызывают заболевания по всему миру. Своевременное выявление возбудителя и его чувствительности к лекарственным препаратам позволяют снизить количество осложнений, уменьшить риск летальных исходов, подобрать адекватную и эффективную терапию. Заблаговременное определение чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам является важной диагностической целью в практической медицине, санитарно-гигиенической службе, экологической и пищевой промышленности. С появлением в медицинской практике антибиотиков и последующим формированием устойчивости к ним микроорга-

низмов возникла необходимость оценки чувствительности возбудителей к данным препаратам как ориентира для выбора лекарственной терапии. Таким образом, в современных условиях широкого распространения антибиотикоустойчивых, в том числе и полирезистентных, штаммов микроорганизмов рациональная химиотерапия и химиопрофилактика вызываемых ими инфекционных болезней, а также оценка эффективности новых лекарственных препаратов возможны только при условии определения степени чувствительности к ним микроба-возбудителя. Существующие современные методы определения чувствительности, несмотря на свои несомненные достоинства, не позволяют быстро и качественно проводить исследования на антибиотикочувствительность микроорганизмов в силу некоторых недостатков, основными из которых является, во-первых, потребность в выделении чистой культуры. Эта процедура занимает от 3 до 10 дней, что не позволяет своевременно начать и проводить адекватную индивидуальную

специфическую терапию. Во-вторых, невозможность оценить роль многих некультивируемых микроорганизмов в этиологии заболевания, а также тех, которые погибают на этапах доставки материала в лабораторию. В-третьих, трудоемкость и малая пропускная способность, громоздкость и/или дороговизна существующих экспресс-методов.

Всё это свидетельствует о необходимости создания новых методических приёмов, позволяющих судить о степени чувствительности микроба-возбудителя к антибиотикам в более короткие сроки после начала исследования. Таким требованиям соответствуют различные типы биосенсоров. Ранее были разработаны амперометрические микробные биосенсоры для определения соединений, угнетающих развитие микроорганизмов. Предложены биосенсоры для определения цианидов и синильной кислоты по подавлению респираторной активности *Nitrosomonas europaea*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas fluorescens* [3, 5]. Разработана проточная система CellSense с микробными биосенсорами на основе печатных графитовых электродов с иммобилизованными *Escherichia coli*, сигналом которых служит ток восстановления, измеряемый в присутствии медиатора электронного переноса – ферроцианида калия [4]. Однако приведенные системы являются косвенными и нуждаются в присутствии медиатора-посредника для оценки сигнала, что, в свою очередь, может привести к ошибкам измерения и усложняет процедуру проведения экспериментов.

Цель. Разработка электрохимических биосенсоров на основе печатных графитовых электродов для определения чувствительности клеток *E.coli JM109* к антимикробным препаратам.

Материалы и методы

Электрохимические исследования проводили с помощью потенциостата «PGSTAT AUTOLAB 12» («EcoChemie», Нидерланды), снабженного программным обеспечением GPES, в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,05 М NaCl, pH 7,4 (рабочий буфер), при комнатной температуре. В работе использовали трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП «ЭЛКОМ», Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода — 2 мм. Цикловольтамперограммы (CV) регистрировали при скорости сканирования 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии (SWV): начальный потенциал 600 мВ, конечный потенциал -600 мВ (для восстановительных процессов), шаг потенциала 10 мВ, амплитуда 20 мВ, частота 10 Гц. В работе использовались следующие реактивы: дидодецилдиметиламмоний бромид (ДДАБ) фирмы Sigma-Aldrich (США), ампициллин, эритромицин, цефепим, амикацин-ваил. В качестве биологического материала использовалась очищенная культура *E.coli JM109*. Концентрация клеток в 50 мкл была подсчитана методом серийных разведений и высеванием на агаризованную среду [5].

Приготовление биосенсоров. На поверхность рабочего графитового электрода наносили 2 мкл свежеприготовленного 0,1 М раствора ДДАБ в хлороформе (и оставляли на 20 мин. при +4°C), после испарения хлороформа ДДАБ наносили 2 мкл суспензии клеток *E.coli* (концентрация клеток на электроде 16×10^6 клеток/сенсор). Инкубировали биосенсор в течение 30-ти мин. при +37°C. После

инкубации модифицированный электрод опускали в рабочий буфер и выдерживали при +37°C – 25 мин. для стабилизации системы.

Постановка экспериментов. Каждый электрод использовался однократно и только с одним антибиотиком. В качестве контроля использовались аналогичные электроды, содержащие ДДАБ/*E.coli JM109*, но вместо добавки антибиотика производилась добавка рабочего буфера. Объем вносимого в систему вещества составлял 5 мкл. Антибиотики были подобраны исходя из спектра действия. Ампициллин, амикацин-ваил и цефепим использовали в концентрации 500 мкг/мл. Эритромицин — в концентрации 10 мкг/мл. Измерение электрохимических параметров электродов проводилось с часовым интервалом. После каждого измерения система помещалась в термостат при +37°C для соблюдения адекватных условий жизнедеятельности микроорганизмов. Диапазон времени, необходимый для получения результатов о чувствительности *E.coli JM109* к антибиотикам, составляет от 4-х до 6-ти ч в зависимости от вида антибиотика. Значение снижения сигнала определялось по формуле:

$$I\% = \frac{I_t}{I_1} \times 100\%,$$

где I_1 -величина тока базового значения, I_t -величина тока после добавления в систему антибиотика, t -время инкубации с антибиотиком ($t=1,2,3...n$), $I\%$ -искомая величина.

Результаты и их обсуждение

Первые эксперименты были направлены на определение возможности детектировать *E.coli JM109* непосредственно на электроде прямым методом

(без вторичных посредников). При измерении электрохимических параметров ПЭ/ДДАБ на циклической вольтамперограмме отсутствуют пики, а при встраивании в матрицу (ДДАБ) клеток *E.coli JM109* появляется характерный катодный пик в области от -0,4V, который в дальнейшем был принят в качестве базового анализируемого сигнала. На рис. 1 представлены циклические вольтамперограммы для электрода, модифицированного ДДАБ (ПЭ/ДДАБ), и электрода, содержащего ДДАБ и *E.coli JM109* (ПЭ/ДДАБ/*E.coli JM109*). На рис. 2 представлены квадратно-волновые вольтамперограммы для ПЭ/ДДАБ и ПЭ/ДДАБ/*E.coli JM109*.

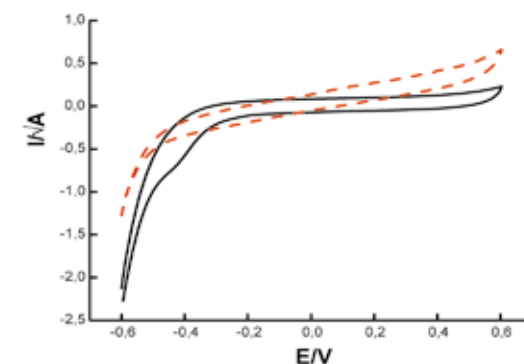


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы электрода, модифицированного ДДАБ(пунктирная линия) и электрода ДДАБ/*E.coli JM109* (сплошная линия) в аэробных условиях, скорость сканирования 100мВ/с. Концентрация клеток — 16×10^6 КОЕ/электрод. Объем электролита — 1 мл, 0,1 М калий-фосфатного буфера, 0,05 М NaCl pH 7,4.

Появление катодного пика в области -0,4 V свидетельствует о наличии электронного переноса между *E.coli JM109* и поверхностью рабочего электрода. В работе L. Peng и др. [6] исследовали электрохимические параметры клеток *Shewanella oneidensis* при иммобилизации на стеклоглеродном электроде.

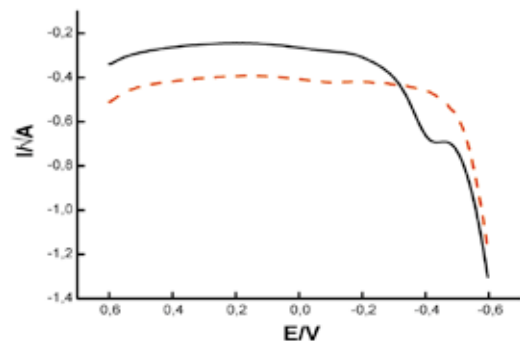


Рис. 2. Квадратно-волновые вольтамперограммы электрода, модифицированного ДДАБ (пунктирная линия) и электрода ДДАБ/*E.coli JM109* (сплошная линия) в аэробных условиях. Частота — 10 Гц. Концентрация клеток — 16×10^6 КОЕ/электрод. Объем электролита — 1 мл, 0,1 М калий-фосфатного буфера, 0,05 М NaCl, pH 7,4.

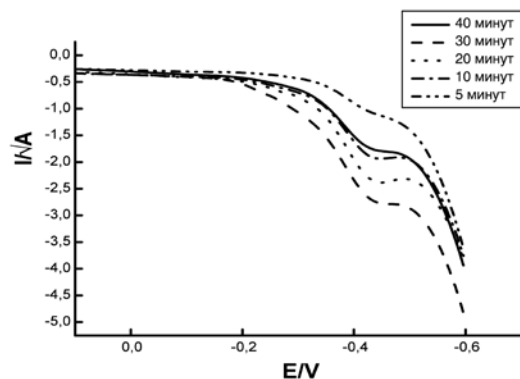


Рис. 3. Квадратно-волновые вольтамперограммы для электродов ДДАБ/*E.coli JM109* в аэробных условиях, в зависимости от времени инкубации клеток на электроде при +37°C. Концентрация клеток 16×10^6 КОЕ/электрод. Время инкубации электродов с клетками в электролите — 25 мин. Объем электролита — 1 мл, 0,1 М калий-фосфатного буфера, 0,05 М NaCl, pH 7,4.

Электронный перенос между бактериальными клетками и поверхностью рабочего электрода происходил с участием цитохрома C, локализованного на внешней мембране клетки, и окислительных мембранных белков OmcA и MtrC. Авторы зарегистрировали пик в циклической вольтамперограмме на не модифициро-

ванном стеклоуглеродном электроде, равный -0,42 V. Полученные нами данные согласуются с данными работы [6].

Время инкубации клеток, необходимое для адсорбции клеток на электроде, а также время, необходимое для стабилизации системы в буфере для получения более четких характеристик анализируемого сигнала, определялось экспериментальным путем. На рис. 3 представлены квадратно-волновые вольтамперограммы для ПЭ/ДДАБ/*E.coli JM109* в зависимости от времени инкубации.

Полученные характеристики сигналов в зависимости от времени инкубации приведены в табл.

Были проведены серии экспериментов по определению чувствительности *E.coli JM109* к различным антибиотикам. На рис. 4 представлена диаграмма, отражающая зависимость величины снижения сигнала от времени инкубации ПЭ/ДДАБ/*E.coli JM109* с различными антибиотиками. Оптимальным является время инкубации, равное 30 мин. За 100% принималась величина катодного тока, измеренная перед добавлением в систему антибиотика.

Для Цефепима и Амикацина максимальное снижение величины катодного тока на 92% и 81% соответственно происходит через 5 ч от момента инкубации системы с антибиотиком. Для Ампициллина максимальное снижение величины катодного тока происходит через 4 ч и составляет 95%. Эритромицин не дает снижения величины катодного тока, а наоборот происходит его увеличение. Через 5 ч высота катодного пика составляет 225%, т.к. данный антибиотик не действует на *E.coli JM109* в концентрации 10 мкг/мл.

Выводы

Разработана система электроанализа

Таблица

Характеристики анализируемого сигнала от электрода ПЭ/ДДАБ/*E.coli JM109* в зависимости от времени инкубации клеток на электроде.

Время инкубации	Положение пика	Высота пика	Площадь пика
5 минут	-0,411	8,79 e-8	5,87 e-9
10 минут	-0,416	2,34 e-7	2,91 e-9
20 минут	-0,416	3,08 e-7	3,77 e-8
30 минут	-0,421	4,65 e-7	4,50 e-8
40 минут	-0,411	2,44 e-7	2,18 e-8

для бактериальных клеток *E.coli JM109* на печатных графитовых электродах, модифицированных ДДАБ. Чувствительность *E.coli JM109* к ряду антибиотиков (амикацин, цефепим, ампициллин, эритромицин) была исследована с помощью электрохимических методов (циклвольтамперометрия, квадратно-волновая вольтамперометрия). К преимуществам данной системы можно отнести применение электродов, полученных методом

трафаретной печати, что в свою очередь приводит к миниатюризации электроанализа, возможности модификации рабочей поверхности электродов, широкому диапазону рабочих потенциалов; использование минимальных объемов исследуемого материала (1-2 мкл); отсутствие вторичных посредников, что сокращает время и упрощает процедуру анализа.

Список литературы

1. *Kaitanis C., Santra S., Perez J.M.*

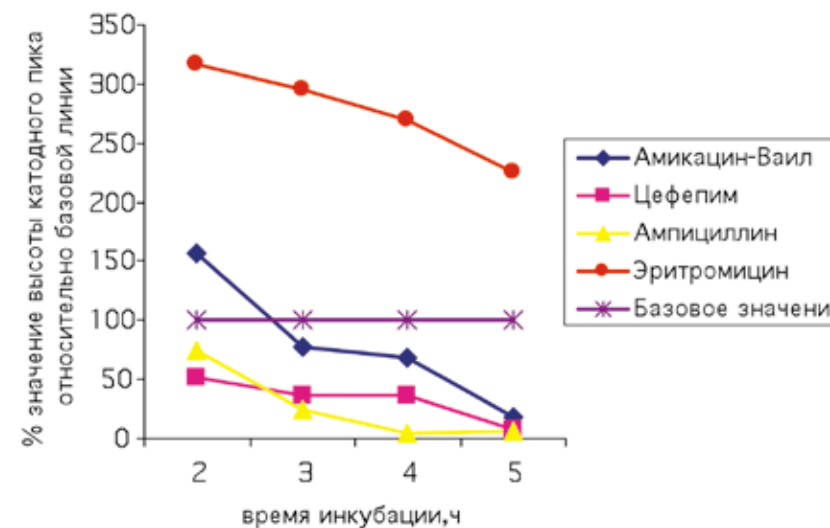


Рис. 4. Сводная диаграмма данных по экспериментам, проведенным на модифицированных электродах с кишечной палочкой штамма *JM109* (16×10^6 КОЕ/электрод) с добавлением в систему различных антибиотиков (цефепим-Cf, ампициллин-Amp, амикацин-Amk, эритромицин-Em в объеме 5 мкл (концентрации веществ указаны в названии оси)) и в качестве контроля с добавления 5 мкл буфера.

Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010. P. 408-423.

2. *Здравоохранение в России*. 2009: Стат.сб./Росстат. М. 2009. 365 с.
3. *Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Майстренко В.Н.* Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине. 2010. с. 416.
4. *Farre M., Barcelo D.*, Characterization of wastewater toxicity by means of a

whole-cell bacterial biosensor, using *Pseudomonas putida* in conjunction with chemical analysis // *J. basic Microbiol.* 46 (2006) 5. P. 339-347.

5. ГОСТ Р 52816-2007.
6. *Peng L., You S., Wang J.*, Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *shewanella oneidensis* // *Biosensor and Bioelectronics*. 2010. P.1248-1251.

Invesbidgation of antibiotic resistance of microorganisms by the usage of electrochemical methods

Ya.M. Chalenko, V.V. Shumyanceva, S.A. Ermolaeva, A.I. Arhcaikov

Electrochemical method for analysis of *Escherichia coli* strain JM109 by cyclic voltammetry and square wave voltammetry was developed. Based on the electrochemical activity of bacterial cells a system for determining the sensitivity of microbiological material to antibiotics was proposed. Electrochemical method provides data on antibiotic resistance of *E.coli* JM109 cells for 2-5 hours.

Key words: *E.coli* JM109, electrochemistry, antibiotic resistance.



ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Селекционно-генетическая и экспериментальная работа с мини-свиньями светлогорской популяции

Н.В. Станкова, Г.Д. Капанадзе

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: к.б.н. Станкова Наталья Владимировна sinayva@yandex.ru

Описаны приемы селекционной работы в популяции лабораторных светлогорских мини-свиней. Приведено сравнение основных зоотехнических показателей мини-свиней различных пород.

Ключевые слова: светлогорские мини-свиньи, селекция, эксперимент.

Использование мини-свиней для медико-биологических целей является актуальным направлением лабораторного животноводства как у нас в стране, так и за рубежом. Ведутся различные работы по усовершенствованию этого вида лабораторных животных в Англии, Японии, Германии, США и других странах, где все шире используются карликовые свиньи в качестве биологических моделей. Они играют важную роль во многих медико-биологических исследованиях, касающихся сотен заболеваний, а также изучения широкого круга проблем, имеющих важное селекционно-генетическое значение. Трудно переоценить огромные возможности доклинических испытаний возрастающего потока новых фармакологических препаратов на свиньях, что надежно прodelьвать на мышах, крысах и других мелких традиционных лабораторных животных часто невозможно, поскольку эти животные, в отличие от свиней, не являются всеядными. Трудно-

сти возникают и из-за разного липидного обмена и других причин [2, 6]. В нашем Центре продолжается работа по усовершенствованию светлогорских мини-свиней отечественной селекции.

Материалы и методы

В прошлых номерах мы рассказывали о выведении и системе разведения светлогорских мини-свиней [1, 4, 5]. В имеющейся популяции ведется чистопородное разведение по линиям. Основными селекционируемыми признаками считаются: низкая живая масса, стрессустойчивость, белая масть. Здесь мы приводим в качестве сравнения некоторые показатели светлогорских мини-свиней с различными зарубежными породами.

Результаты и их обсуждение

Для достоверного проведения какого-либо эксперимента с использованием животных необходимо определенное их количество. В лабораторных условиях удобны

Таблица

Живая масса различных пород мини-свиней в разные периоды роста, кг

Возраст	Корсиканские	Юкатанские	Синклер S-1	Хенфордские	Геттингенские	Минисибс	Светлогорские
при рождении	-	-	-	-	0,6	0,45	0,45
в 2 мес	-	6	7	8	6	4,5	4
в 6 мес	26	18	19	34	25	17	13
в 1 год	45	35	37	50	37	30	25
в 3 года и старше	83	70	60	70	60	45	40

животные с минимальными размерами, что удешевляет расходы на их содержание. Для мини-свиней это особенно актуально, т.к. это позволит содержать их не только в классических групповых станках, но и в стеллажах. Содержание животных маленького размера в условиях обычных вивариев позволяет значительно экономить расходы на помещение и в несколько раз сокращает затраты на кормление. В табл. приведены данные по живой массе светлогорских мини-свиней в сравнении с другими зарубежными породами [6].

Светлогорские мини-свиньи значительно меньше большинства приведенных пород. При этом высота в холке у племенных животных не превышает 45 см у свиноматок и 40 см у хряков. Этому удалось достичь за счет целенаправленного под-

бора родительских пар и индивидуально-го отбора потомства, а также детального изучения иммуногенетической совместимости [3]. Все этапы роста животных систематически прослеживаются, оценивается экстерьер и стрессустойчивость, на основе анализа данных ведется жесткая выбраковка. В то же время в популяции сохраняется линия животных с живой массой 50-60 кг, эти животные представляют интерес с позиций проведения экспериментов по стоматологии, хирургии, ксенотрансплантации и др.

Ниже приведены фотографии животных. На рис. 1 показан один из лучших молодых хряков, живая масса в возрасте 1 год составила 17,5 кг. А на рис. 2 – ремонтная свиноматка в возрасте 1,5 года с живой массой 25 кг.



Рис. 1. Хряк в возрасте 1 год, масса 17,5 кг.



Рис. 2. Свиноматка в возрасте 1,5 года, масса 25 кг.



Рис. 3. Хряк в возрасте 4,5 года, масса 24 кг.



Рис. 4. Свиноматка в возрасте 3,5 года с поросятами.

На рис. 3 показан взрослый хряк-производитель в возрасте 4,5 года с живой массой 24 кг. И на рис. 4 — взрослая свиноматка в возрасте 3,5 года с живой массой 39 кг, многоплодие 10 гол. Здесь также заметно преобладание белой масти у поросят, так как эта масть доминирует над остальными. В данном случае отец был черной масти.

На рис. 1, 2, 3, 4 видно, что животные имеют следующие характеристики экстерьера: белая – основная и черная – дополнительная масти; голова с прямым профилем; стоячие короткие уши; туловище короткое; спина ровная прямая; крепкие прямые конечности.

На ряду со снижением живой массы, селекционная работа ведется и по увеличению воспроизводительных качеств. Здесь нами используются классические приемы отбора и подбора как в племенном свиноводстве, но показатели крупноплодности и молочности учитываются наоборот. Следует отметить, что при сравнительной оценке живой массы поросят при рождении необходимо учитывать многоплодие, поскольку эти два показателя находятся в высокой отрицательной корреляционной зависимости. Особое внимание уделяется сохранности приплода, т.к. снижение живой массы

ведет к снижению жизнеспособности. Получение полноценного потомства обеспечивается оптимальными условиями содержания супоросных свиноматок в новом оборудованном виварии.

При сниженной живой массе светлогорские свиноматки имеют хорошее многоплодие — 8 гол. в среднем на одну основную свиноматку, а полученные поросята — высокую сохранность от рождения до 2 мес. (86%). Другие породы имеют следующие показатели по многоплодию: корсиканские свиньи — 3-8 гол.; юкатанские — 6-7 гол.; хенфордские — 6 гол.; геттингенские — 5,6-7,5 гол.; минисибс — 8-8,5 гол. [6]. Половая зрелость у мини-свиней наступает в возрасте 6 мес; однако, мы не рекомендуем пускать в случку свинок младше 10 мес; во избежание появления ослабленного потомства, большого количества мертворожденных поросят и различных родовых травм. Светлогорские свиноматки в первый опорос обычно приносят 5-7 поросят, что так же считается хорошим показателем.

На рис. 5 представлена одна из наших лучших молодых свиноматок. Живая масса поросят при рождении (крупноплодность) в среднем составила 0,41 кг.

Селекция животных ведется и по по-



Рис. 5. Подсосная свиноматка с поросятами.

веденческим реакциям. Отбираются животные добронравные, не агрессивные и не пугливые. Такие животные легко используются в экспериментах, исключая фиксацию или анестезию. Например, при изучении работоспособности с использованием беговой дорожки, а также изучения действия различных препаратов при физических нагрузках.

На рис. 6 показан хрячок в возрасте 1,5 года, он спокойно относится к движущейся дорожке, не сопротивляется, бежит равномерно. При средней скорости 7-8 км/ч может бежать 30-35 мин. Неуравновешенные животные, напротив,



Рис. 6. Изучение работоспособности на мини-свиньях.

пытаются выпрыгнуть из клетки, переворачиваются, садятся на задние ноги, ведут себя агрессивно. Такое поведение вызывает искажение физиологических и биохимических показателей животного, так как стрессовое состояние негативно влияет на чистоту эксперимента.

Таким образом, светлогорские мини-свиньи полностью соответствуют требованиям, предъявляемым к лабораторным животным, и составляют достойную конкуренцию зарубежным породам. Они живут на ограниченной площади, терпимо относятся к собственным сородичам, размножаются в любые сезоны, не нуждаются в каких-то особых условиях содержания, имеют высокую плодовитость и быстрое созревание, уход за ними несложный, а сами животные безопасны для работающих с ними людей. Для них характерна крепкая конституция, объемистый костяк, относительно развитая мускулатура, прямые, развитые конечности, уравновешенный темперамент и добрый нрав. Эти мини-свиньи удобны и практичны для проведения различных экспериментов.

Список литературы

1. *Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А.* Светлогорская популяция мини-свиней // Биомедицина. 2007. № 6. С. 70-80.
2. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под редакцией Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль 2С. 2010. С. 358.
3. *Новиков А.А., Романенко Н.И., Семак М.С.* Иммуногенетические маркеры и их использование в селекции // Современные аспекты селекции, биотехнологии, информатики в племенном животноводстве. ВНИИплем. М. 1997. С. 97-105.
4. *Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д.* Оптимизация светлогорских мини-свиней для биомедицинских исследований // Биомедицина. 2010. № 5. С. 33-49.
5. *Станкова Н.В.* Типы крови человека и мини-свиней светлогорской популяции // Вестник РАСХН. 2008. № 6. С. 29-30.
6. *Тихонов В.Н.* Лабораторные мини-свиньи: генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск. СО РАН. 2010. 304 с.

Selection, genetic and experimental work with minipigs of Svetlogorsk population

N.V. Stankova, G.D. Kapanadze

Conducting breeding selection work in population of laboratory Svetlogorsk minipigs are described. Comparison of the basic zootechnical indicators different populations of minipigs is resulted.

Key words: svetlogorsk minipigs, selection, experiment.



Возврат ранее утерянного гена *misty* в генотип мышей C57BL/Ks-Lepr^{db/+}

Т.Б. Бескова, Н.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов,
О.И. Степанова, Е.Л. Матвеевко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Бескова Татьяна Борисовна, тел. (495)561-5264

В коллекционном фонде НЦБМТ РАМН поддерживается мутантная линия мышей C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+m, гомозиготы которых являются адекватной моделью сахарного диабета 2 типа. Особенность линии – гомозиготы обоего пола бесплодны. Линия поддерживается путем скрещивания гетерозигот. Отбору гетерозигот способствует мутантный рецессивный ген *misty*, который в гомозиготном состоянии осветляет окраску шерсти мышей. В результате кроссинговера маркерный ген был утерян, и отбор гетерозигот по внешним признакам стал невозможен. Восстановление маркерного гена *misty* в геноме мышей линии C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+m явилось целью настоящей работы. Стандартными генетико-селекционными методами ген *misty* был переведен из линии MLR/Y в геном линии C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+, которой, соответственно, был возвращен прежний символ C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+m.

Ключевые слова: геном, гетерозиготы, гомозиготы, сахарный диабет, биомодель.

Диабет 2 типа является самой распространенной формой сахарного диабета у людей. Из всех заболевших сахарным диабетом 85-90% имеют 2 тип данного заболевания. Сахарный диабет 2 типа – это хроническое заболевание, которое характеризуется нарушением механизмов взаимодействия инсулина с клетками за счет того, что рецепторы клеток теряют к нему чувствительность, или нарушением работы поджелудочной железы, приводящее к тому, что железа перестает синтезировать инсулин в нужном количестве.

Причиной возникновения диабета 2 типа является генетическая предрасположенность [3]. Мыши линии C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+m являются адекватной

биомоделью сахарного диабета 2 типа. Они имеют врожденный сахарный диабет со всеми клиническими его проявлениями: высокое содержание глюкозы в крови (превышение нормы в 5-6 раз), нарушение углеводного и липидного обмена и, как следствие, ожирение, полиурия, полифагия, полидипсия [6, 5]. В НЦБМТ РАМН (ранее НИЛЭБМ АМН СССР) эта линия поступила из Джексоновской лаборатории США в 1978 г., поддерживается в коллекционном фонде и используется в экспериментальной работе. Мутантный рецессивный ген Lepr^{db}-leptin receptor, в гомозиготном состоянии вызывающий диабет, локализован в 4-й хромосоме (8-я группа



Рис. 1. Мышь со светло-серой окраской шерсти, заметно отличающаяся от черной, взятой из того же помета, является гомозиготой по маркерному гену *misty*.

сцепления), там же расположен и ген *misty* (*m*). Последний, осветляя окраску шерсти у мышей гомозигот (+m/+m), является маркером оппозитной хромосомы, не несущей гена Lepr^{db} [2].

Поскольку мыши-диабетики (db/db) обоих полов бесплодны из-за ожирения (недоразвиты яичники и семенники, изменен гормональный фон), то линия поддерживается скрещиванием гетерозигот. При этом, наряду с гомозиготами (db+/db+) черного цвета с ожирением и гетерозиготами (db+/-) черного цвета и нормального веса, выщепляются и нормальные гомозиготы (+m/+m), т.е. особи, которые являются носителями маркерного гена *misty* и имеющие темно-серую окраску. Они отличаются по масти от остальных животных, их легко выделить и удалить из разведения (рис. 1). Таким образом, ген *misty* способствует более эффективному ведению селекции. Однако в 1999 г., видимо, в результате кроссинговера, маркерный ген *misty* был утерян, новым символом линии становится C57BL/Ks-Lepr^{db}+.

Вместе с утратой гена *misty* возможности отбора и выбраковки нормальных гомозигот (+m/+m) свелись к нулю. Это означает, что при производстве мышей

db/db скрещивание производится «вслепую», скрещиваются все генотипы, за исключением диабетиков. Ниже приведена схема производства мышей-диабетиков в зависимости от наличия или отсутствия маркерного гена *misty*.

Таким образом, при наличии гена *misty* производство мышей-диабетиков (db/db) возрастает в 3 раза по сравнению со скрещиванием, производимым «вслепую». Вместе с тем, для поддержания мутантных линий мышей, неспособных к естественному размножению, используется метод трансплантации яичников от мутантов-гомозигот (доноров) их фертильным сестрам (реципиентам) нормального фенотипа, чем мы и смогли воспользоваться [4]. Однако в данном случае, помимо технических трудностей, обусловленных сильным ожирением мышей-диабетиков, этот метод оказался еще и неэффективным в силу очень низкой плодовитости самок-реципиентов, что связано, по всей видимости, с гипофункцией яичников, трансплантированных от самок db/db.

Кроме того, мы пытались отбирать гетерозигот для скрещивания по показателю уровня сахара в крови, полагая, что у гетерозигот его уровень должен значительно превышать показатели нормальных мышей гомозигот (+/+). Результаты проведенного эксперимента показали не состоятельность и данного варианта отбора гетерозигот из-за отсутствия заметной разницы по уровню глюкозы в крови у исследуемых животных.

На основании изложенного, представляется наиболее целесообразным путь повторного введения маркерного гена *misty* в генотип мышей C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+, что и явилось целью настоящей работы.

Схема производства мышей-диабетиков в зависимости от наличия или отсутствия маркерного гена *misty*

Вариант I – при наличии гена *misty* в производстве участвуют только гетерозиготы

Гаметы	db+	+m
Гаметы	db+/db+	db+/+m
+m	db+/+m	+m/+m

Ожидаемый выход потомства при скрещивании гетерозигот
 1 – db+/db+ – 25%
 2 – db+/+m – 50%
 1 – +m/+m – 25%

Вариант II – при отсутствии гена *misty* скрещивание производится «вслепую»
 1 – гетерозиготы гетерозиготы

Гаметы	db+	+
Гаметы	db+/db+	db+/+
+	db+/+	+/+

Выход потомства
 1 – db+/db+
 2 – db+/+
 1 – +/+

2 – гетерозиготы гомозиготы

Гаметы	db+	+
Гаметы	db+/+	+/+
+	db+/+	+/+

Выход потомства
 2 – db+/+
 2 – +/+

3 – гомозиготы гомозиготы

Гаметы	+	+
Гаметы	+/+	+/+
+	+/+	+/+

Выход потомства
 4 – +/+

Итого ожидаемый выход мышей при скрещивании «вслепую»:

1 – db+/db+ – 8,3%
 4 – db+/+ – 33,3%
 7 – +/+ – 58,3%

Материалы и методы

Носителями гена *misty* в коллекционном фонде Центра являются также мыши линии MLR/Y. Для перевода гена *misty* на генотип C57BL/Ks-Lepr^{db/+} была использована стандартная схема скрещиваний:

- скрещивание мышей MLR/Y и C57BL/10Sn с получением F1 – гетерозигот (черной масти), несущих ген *misty*;
- получение гибридов F2 и отбор гомозигот по гену *misty* (мышей темно-серого окраса);
- 10 последовательных скрещиваний гибридов F2 генотипа +m/+m с мышами C57BL/Ks-Lepr^{db/+}, проводя анализирующее скрещивание в каждом поколении;
- проверка потомков десятого кросса на носительство гена Lepr^{db/+m}.

Результаты и их обсуждение

Проверкой потомков десятого поколения было установлено одновременное носительство ими гена Lepr^{db/+} и *misty*, т.е. Lepr^{db/+m}, что позволило сформировать племенное ядро и в дальнейшем поддерживать линию методом тесного инбридинга – братско-сестринского скрещивания. В настоящее время, после введения гена *misty*, линия прошла 10 поколений (№10F10). С целью подтверждения идентичности животных вновь сформированного племенного ядра Lepr^{db/+m} с исходным племенным ядром – Lepr^{db/+} была проведена реципрокная изотрансплантация кожи по общепринятой методике [1, 2]. Ценность метода заключается в том, что он позволяет контролировать гомозиготность по большому числу генов, так как совместимость тканей – полигенный признак: дает возможность выявить очень слабые генетические различия между животными одной линии, обусловленные остаточной

гетерозиготностью или спонтанными мутациями. Критерием гомозиготности инбредных животных в опытах с трансплантацией кожи служит 100% приживление трансплантатов в пределах линии [7].

В опыте было использовано 7 мышей диабетиков – гомозигот из обоих племендер в возрасте 2–3 месяцев. Животные были разбиты на две группы: первые составляли 3 особи db/db – из племендер C57BL/Ks-Lepr^{db/+}; вторую – 4 особи db/db из племендер C57BL/Ks-Lepr^{db/+m}.

Результаты трансплантации кожных лоскутов представлены в табл. и на рис. 2. Отторжение трансплантатов по техническим причинам во внимание не принимается, поскольку устанавливается уже на 7-й день в момент снятия повязки, тогда как приживаемость кожных лоскутов определяется через 100 дней. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что все трансплантаты прижились стопроцентно. Следовательно, сублиния C57BL/Ks-Lepr^{db/+m} с восстановленным маркерным геном *misty* сохранила генетический статус линии. Она практически не отличается от исходной линии и фенотипически (по уровню глюкозы в крови). Так, если у исходной линии



Рис. 2. А – мышь, у которой трансплантант отторгся, хорошо видно пустое «окошко»; Б – трансплантант прижился, на нем имеется волосая покров.

Таблица

Результаты трансплантации кожных лоскутов

Схема трансплантации	Количество трансплантантов	Количество прижившихся трансплантантов	Количество неприжившихся трансплантантов (в том числе по техническим причинам)
группа 1 группа 2	7	6	1 (1)
группа 2 группа 1	7	6	1 (1)
группа 1 группа 1	2	2	0 (0)
группа 2 группа 2	4	3	1 (1)

Примечание: В скобках указано число трансплантантов, отторгшихся по техническим причинам, каковыми могут быть кожный зуд (расчесывание места трансплантации), смещение трансплантанта в момент наложения повязки.

C57BL/Ks-Lepr^{db/+} уровень глюкозы составлял 18,7 моль/л, то у линии с восстановленным геном misty – C57BL/Ks-Lepr^{db/+} m он равен 17,8 моль/л, разница статистически недостоверна. Таким образом, линия C57BL/Ks-Lepr^{db/+} m вполне может быть использована в качестве адекватной модели сахарного диабета 2 типа.

Выводы

Длительная (на протяжении нескольких лет) и трудоемкая работа по восстановлению утерянного маркерного гена misty успешно завершена и оправдана следующими положениями. Во-первых, наличие гена misty в геноме линии мышей позволяет избежать неэффективных, слепо проводимых скрещиваний в племядре при производстве мышей диабетиков-гомозигот. Во-вторых, выход мышей диабетиков существенно увеличивается по сравнению со 100%-м скрещиванием всех потомков, что, в свою очередь, снижает затраты как материально-денежных средств, так и труда при получении биомоделей.

Список литературы

1. **Бескова Т.Б.** Модификация метода реципрокной трансплантации кожи у лабораторных мышей // Биомедицина. 2007. № 6. С.161-163.
2. **Бландова З.К.** Контроль гомозиготности инбредных линий мышей и крыс методом трансплантации кожи. Методические указания. М. 1982.
3. **Дубровская С.** Настольная книга диабетика. М.: РИПОЛ классик. 2009.
4. **Игнатьева Е.Л.** Микрохирургический метод поддержания мутантной линии мышей, неспособных к размножению / В сб.: Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. М. 1988. С.76-78.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева. М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
6. **Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Баранова О.В., Галахова Т.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Степанова Е.А., Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А.**

Мутантные мыши C57BL/Ks-Lepr^{db/+} как генетическая модель сахарного диабета 2 типа // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. том 144. № 12. С. 664-667.

7. **Billingham R.E., Silvers W.K.** Inbred animals and tissue transplantation immunity // Plast and reconstr.: surg. and. transpl. bill. 1959. vol. 28. P.199-406.

Renewal of lost gene misty in genotype C57BL/Ks-Lepr^{db/+} mice

T.B. Beskova, N.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, O.I. Stepanova, E.L. Matveenko

In collection fund of Scientific Center of biomedical technologies under the RAMS mutant strain C57BL/Ks-Lepr^{db/+}m mice is supporting, homozygote of these mice is adequate model of pancreatic diabetes II type. The special feature is that homozygote of both sex are infertile. Strain is supporting by heterozygote crossing. Mutant recessive gene misty promotes heterozygote selection. This gene in homozygote status refines mice hair color. As the result of crossingover marker gene was lost, and selection of heterozygote by external indication became impossible. Renewal of marker gene misty in genome of C57BL/Ks-Lepr^{db/+}m mice strain is the aim of this work. Gene misty was transfer from strain MLR/Y in genome C57BL/Ks-Lepr^{db/+} strain by standard genetics and selection methods, so the name of strain C57BL/Ks-Lepr^{db/+}m was return back.

Key words: gene, heterozygotes, homozygotes, a diabetes, biomodel.



Церебропротекторные эффекты пирацетама и его комбинации с мелаксеном при глобальной ишемии головного мозга у крыс

Е.В. Ганцгорн¹, Ю.С. Макляков¹, Д.П. Хлопонин¹, А.Е. Матухно¹,
О.М. Куделина¹, Н.Н. Каркищенко²

¹ – Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Ганцгорн Елена Владимировна strelez_alena@mail.ru

С помощью спектрального анализа ЭЭГ на модели глобальной церебральной ишемии у крыс изучались эффекты пирацетама и мелаксена в условиях нарушения мозгового кровообращения. Установлено, что превентивное применение комбинации этих лекарственных препаратов значительно уменьшает степень неблагоприятного воздействия циркуляторной ишемии на функциональное состояние головного мозга. Полученные результаты могут быть использованы в клинической практике для лечения ишемических и нейродегенеративных заболеваний головного мозга.

Ключевые слова: пирацетам, мелаксен, церебральная ишемия, ЭЭГ.

Большая медико-социальная значимость проблемы нарушений мозгового кровообращения (НМК) объясняется их широкой распространенностью, тяжестью течения, высокими показателями инвалидизации и смертности. Вершиной «айсберга» цереброваскулярных заболеваний являются инсульты и острые церебральные сосудистые кризы [2]. Несмотря на достижения последних лет в области реаниматологии, неврологии и фармакологии, летальность по причине острых НМК занимает одно из ведущих мест в структуре смертности, составляя в России 21,4%. Острые НМК прочно удерживают первое место среди всех причин нетрудоспособности и первичной инвалидизации – 3,2 случая на

10 тыс. населения нашей страны [6]. В мировом масштабе острые НМК занимают третье место в структуре общей смертности после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [3, 9]. В связи с этим, проблема эффективной патогенетической терапии сосудистых поражений головного мозга является одной из важнейших для современной медицины, а изучение патогенетических механизмов и поиск новых подходов к лечению НМК – одной из актуальных задач клинической неврологии и фармакологии.

С учетом временной динамики процессов формирования инфаркта мозга принята система последовательных терапевтических мероприятий по его

фармакотерапии. Арсенал антигипоксических средств в настоящее время достаточно широк. К их числу относят антагонисты глутамата и различных модуляторных рецепторов, антагонисты кальция, ноотропы, антиоксиданты и др. [5]. Актуальным является комбинированное применение агентов первичной нейропротекции, в частности, антиоксидантов, и средств вторичной защиты, к числу которых относят и ноотропные препараты (НП) [8]. «Эталонным» НП до настоящего времени остается пирацетам. Основной механизм его действия, как и многих других ноотропов, связан с изменением метаболических, биоэнергетических процессов в нейроне, повышением скорости оборота информационных макромолекул и активацией синтеза белка [4]. Среди антиоксидантных средств особый интерес представляет мелатонин, обладающий, по данным [1], самым мощным нейроантиоксидантным действием. Это обусловлено способностью мелатонина связывать в ткани головного мозга свободные радикалы кислорода, одновременно стимулируя эндогенную систему антиоксидантной защиты (через активацию супероксиддисмутазы и каталазы). Подобные свойства данного гормона в сочетании с иммуномодулирующей активностью оправдывают необходимость его активного использования при разнообразной острой и хронической патологии ЦНС в качестве оригинального церебропротектора [1].

Анализ действия НП представляется важным в связи со сложной композицией отдельных характеристик спектра активности препаратов этого ряда. Важное место среди методов количественной оценки психотропных эффектов лекарственных средств, включая и ноотропы,

занимает количественная ЭЭГ (КЭЭГ), которая позволяет достоверно оценить особенности биоэлектрической активности головного мозга в зависимости от его функционального состояния, а также на фоне действия психотропных веществ [7].

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 40 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г. Животные содержались в условиях вивария при естественном освещении, влажности 55-60% и t воздуха $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в пластиковых клетках размером $55 \times 45 \times 15$ см, с подстилкой из древесных опилок, по 5-6 особей в клетке. Крысы потребляли гранулированный комбикорм (производитель ООО «Лабораторснаб») и воду *ad libitum* в поилках объемом 200 мл. В эксперимент животных забирали после 7-ми дней карантина. Все эксперименты были выполнены в соответствии с рекомендациями по гуманному обращению с лабораторными животными, утвержденными этическим комитетом РостГМУ.

В соответствии с протоколом исследования, животные были разделены на 4 группы, по 10 крыс в каждой:

1) интактная (И) – ложнооперированные животные, получавшие в течение 14-ти дней физиологический раствор в дозе 0,2 мл/сут внутримышечно, у которых воспроизводили все этапы операции без перевязки сонных артерий;

2) контрольная (К) – животные, также в течение 14-ти дней получавшие физиологический раствор в эквивалентном группе И объеме, у которых моделировали глобальную ишемию головного мозга;

3) группа П – животные, получавшие в течение 14-ти дней пирацетам в дозе 300 мг/кг/сут однократно внутримышеч-

но, у которых моделировали глобальную ишемию головного мозга;

4) группа П+М – животные, получавшие в течение 14-ти дней пирацетам в дозе 300 мг/кг/сут однократно внутримышечно и мелаксен в дозе 0,25 мг/кг/сут однократно *per os*, и у которых моделировали глобальную ишемию головного мозга.

За 5 дней до моделирования ишемии головного мозга всем животным в область соматосенсорной коры и гиппокампа (симметрично справа и слева) вживлялись электроды в соответствии с атласом стереотаксических координат головного мозга крысы [10], индифферентный электрод локализовался в лобной пазухе. Операции проводились под эфирным наркозом с помощью стереотаксической установки СЭЖ-4 (производства Института физиологии им. А.А. Богомольца, Украина) и микроманипуляторов для погружения микроэлектродов. Фиксация электродов производилась с помощью стоматологической пластмассы холодной полимеризации «Протакрил» на голове животного. Спектральные характеристики электрограмм мозга определялись с помощью быстрого преобразования Фурье в диапазоне 1-30 Гц. ЭЭГ мозга животных регистрировались монополярно на 8-канальном электроэнцефалографе-анализаторе ЭЭГА-21/26 «Энцефалан 131-03» до и через 24 ч после моделирования ишемии мозга. Изучены показатели относительной спектральной мощности (%) для Δ (дельта) – (1-4 Гц), θ (тета) – (5-7 Гц), α (альфа) – (8-12 Гц) и β (бета) – (13-30 Гц) частотных диапазонов ЭЭГ крыс. Для объективной оценки использовали метод количественного анализа структуры ЭЭГ. Анализировались относительные значения мощностей (ОЗМ) частотных диапазонов.

Ишемизация головного мозга достигалась перевязкой левой и правой сонных артерий. Все хирургические процедуры проводили в стерильных условиях под тиопенталовым наркозом (120 мг/кг массы животного внутрибрюшинно). Рану обрабатывали антисептиком и послойно ушивали. Через 24 ч отмечали количество выживших крыс во всех группах и регистрировали у них ЭЭГ. После этого производили эвтаназию животных под эфирным наркозом.

Статистическую обработку полученных данных проводили на ПК с использованием общепринятых методов параметрической статистики (t-критерий Стьюдента) при помощи пакета статистических программ Statistica for Windows 6.0 (Statsoft, USA).

Результаты и их обсуждение

Анализ выживаемости крыс показал, что в группе И была 0% летальность, в группе К летальность составила 70,5% (из 34 прооперированных крыс 24-часовую окклюзию сонных артерий пережили 10 животных), в группе П показатель летальности составил 49% (выжили 10 крыс из 19 прооперированных). Самый низкий показатель летальности (34%) наблюдался в группе П+М (из 15 прооперированных крыс выжили 10).

При изучении ЭЭГ-спектров, зарегистрированных до моделирования ишемии головного мозга, было установлено, что электрограммы животных групп И и К не имели существенных различий в распределении частотных диапазонов, но отличались от таковых в опытных группах. В группе П увеличивалось представительство высокочастотных диапазонов активности, особенно β-ритма в коре по сравнению с группами И и К (табл. 1).

В группе П+М наблюдалось значи-

Таблица 1

ЭЭГ ОЗМ распределение по диапазонам частот групп животных до ишемии, %

Координаты электродов	Дельта	Тета	Альфа	Бета
Группы И и К				
P4-A2	11,95±0,63	43,53±0,42	6,31±0,23	38,21±0,45
P3-A1	12,28±0,52	44,36±0,56	3,96±0,34	39,40±0,53
C4-A2	5,13±0,71	12,76±0,47	25,72±0,35	56,39±0,46
C3-A1	4,16±0,68	13,40±0,62	23,80±0,42	58,64±0,61
Группа П				
P4-A2	6,51±0,31	44,21±0,64	8,13±0,52	41,15±0,67
P3-A1	4,64±0,24	45,17±0,56	7,08±0,62	43,11±0,54
C4-A2	1,41±0,57	12,06±0,53	27,44±0,55	59,09±0,61
C3-A1	1,12±0,41	11,85±0,49	26,01±0,48	61,02±0,45
Группы П+М				
P4-A2	4,31±0,61	45,11±0,43	9,24±0,48	41,34±0,56
P3-A1	2,25±0,43	46,87±0,41	8,15±0,62	42,73±0,61
C4-A2	0,72±0,52	13,56±0,68	26,23±0,47	60,12±0,58
C3-A1	0,61±0,57	13,24±0,54	24,31±0,53	62,02±0,49

Примечание: P4-A2 – координаты электродов в гиппокампе справа; P3-A1 – координаты электродов в гиппокампе слева; C4-A2 – координаты электродов в соматосенсорной коре справа; C3-A1 – координаты электродов в соматосенсорной коре слева; p<0,05.

Таблица 2

ЭЭГ ОЗМ распределение по диапазонам частот через 24 ч после ишемии в группах, %

Координаты электродов	Дельта	Тета	Альфа	Бета
Группа К				
P4-A2	47,07±0,56	33,67±0,73	3,69±0,43	15,57±0,48
P3-A1	45,60±0,62	36,10±0,68	4,47±0,47	13,83±0,54
C4-A2	34,88±0,47	19,92±0,53	19,64±0,55	25,56±0,61
C3-A1	38,39±0,51	18,86±0,52	18,24±0,59	24,51±0,64
Группа П				
P4-A2	32,15±0,86	34,25±1,03	4,21±0,94	29,39±0,82
P3-A1	34,58±0,92	33,12±0,97	3,74±0,87	28,56±0,95
C4-A2	19,93±0,95	14,39±1,08	21,94±0,94	43,74±0,84
C3-A1	22,16±0,91	15,07±0,89	20,41±0,79	42,36±0,97
Группа П+М				
P4-A2	20,68±1,02	40,64±0,93	5,28±0,78	33,40±1,01
P3-A1	19,11±0,85	41,20±0,86	3,73±0,81	35,96±0,92
C4-A2	13,52±0,92	11,41±0,91	22,32±0,88	52,75±0,83
C3-A1	11,41±0,84	12,32±1,04	21,86±0,76	54,41±0,87

Примечание: P4-A2 – координаты электродов в гиппокампе справа;
 P3-A1 – координаты электродов в гиппокампе слева;
 C4-A2 – координаты электродов в соматосенсорной коре справа;
 C3-A1 – координаты электродов в соматосенсорной коре слева;
 p<0,05.

тельное улучшение функциональной активности коры головного мозга: мощность α - и β -ритмов превышала аналогичные показатели в группах И и К; также происходило увеличение представительства θ -ритма в гиппокампе (табл. 1).

Через 24 ч после проведения окклюзии сонных артерий в группе К произошло значительное перераспределение ЭЭГ ритмов, что служит критерием выраженной гипоксии головного мозга: увеличение Δ -ритма (во всех отведениях), выраженное снижение доминирующего в норме β -ритма в корковых отведениях и θ -ритма в гиппокампе. Наиболее значительные нарушения биоэлектрической активности мозга наблюдались в гиппокампе (табл. 2).

В группе животных П ЭЭГ также претерпела подобные изменения, но они носили не столь выраженный характер (табл. 2).

Однако наиболее благоприятные результаты наблюдались в группе крыс П+М: Δ -ритм увеличился незначительно, а мощность β - и θ -ритмов была близка к уровню интактных животных (табл. 2).

Проведенные исследования показали: использованная модель глобальной ишемии головного мозга у крыс вызывает значительное нарушение церебрального кровообращения, особенно в области гиппокампа, что отражается в динамике частотно-амплитудных показателей количественной ЭЭГ. Параметры КЭЭГ явились маркерами церебральной ишемии и информативными показателями для оценки особенностей влияния изучаемых препаратов на функциональное состояние головного мозга. Установлено, что пирацетам обладает способностью повышать активность головного мозга крыс, проявляя психостимулирующее действие, о чем

свидетельствуют изменения в ЭЭГ показателях: увеличение мощности α - и β -активности в коре. Особенностью же действия комбинации пирацетама и мелаксена у крыс является сбалансированное улучшение функциональной активности и коры головного мозга, и гиппокампа, в пользу чего говорит увеличение мощности доминирующих в норме β - и θ -ритмов.

Выводы

Таким образом, на основании полученных нами результатов, можно констатировать, что пирацетам, а еще в большей степени его комбинация с мелаксеном на модели глобальной церебральной ишемии у крыс способны повышать устойчивость головного мозга к гипоксии, а также оказывать благоприятное влияние на его биоэлектрическую активность. В связи с этим, на наш взгляд, при фармакотерапии и фармакопрофилактике острых НМК целесообразным является включение в стандартный перечень применяемых лекарственных средств нейрогомона мелатонина.

Список литературы

1. **Арушанян Э.Б.** Изучение психотропной активности гормона эпифиза мелатонина - оригинальное направление наших исследований // Эксп. и клин. фарм. 2007. №.6. С. 55-60.
2. **Верещагин Н.В., Пирадов М.А., Суслина З.А.** Инсульт. Принципы диагностики, лечения и профилактики. М.: 2002. С. 208.
3. **Виленский Б.С.** Инсульт: профилактика, диагностика и лечение. Изд. 2-е, доп. – СПб.: Изд-во «Фолиант». 2002. С. 397.
4. **Воронина Т.А.** Гипоксия и память. Особенности эффектов и примене-

- ния ноотропных препаратов // Вестник РАМН. 2000. №9. С. 27–34.
5. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия мозга. – М.: Медицина. 2002. С. 328.
6. *Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В.* Эпидемиология инсульта в России // Журн. неврол. и психиатр. (приложение «Инсульт»). 2003. №8. С. 4-9.
7. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. т.2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. М.: Изд-во ВПК. 2007. С. 448.
8. *Скворцова В.И.* с соавт. Принципы ранней реабилитации больных с инсультом // Журн. неврол. и психиатр. 2002. № 7. С. 28-33.
9. *Hufschmidt A., Lucking C.* Neurologie Compact. Leitlinien für Klinik und Praxis. Thieme Verlag. 2003. 582 p.
10. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates., 4th Edition. 1998. P. 403-405.

Piracetam & piracetam combination with melaxen cerebroprotective effects at global cerebral ischemia in rats

E.V. Ganzgorn, Yu.S. Maklyakov, D.P. Khloponin, A.E. Matukhno, O.M. Kudelina, N.N. Karkischenko

On the base of EEG spectral analysis we've studied the effects of piracetam and its combination with melaxen in the conditions of cerebral blood flow disturbance in a rat model of global cerebral ischemia. It was established, that preventive usage of piracetam & melaxen combination significantly reduces the degree of circulatory ischemia adverse effects on the functional state of the rat brain. The obtained results can be used in clinical practice for the treatment of ischemic and neurodegenerative brain diseases.

Key words: piracetam, melaxen, cerebral ischemia, EEG.

Изучение острой токсичности и раздражающего действия лецитина

А.К. Гусейнов¹, В.Н. Каркищенко², А.В. Сергиенко¹, М.Н. Ивашев¹

¹ – Пятигорская государственная фармацевтическая академия, Пятигорск

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: д.м.н., профессор Ивашев Михаил Николаевич ivashev@bk.ru

Проведенные исследования на куриных эмбрионах и конъюнктиве морских свинок показали, что лецитин биотехнологический не обладает раздражающей активностью и безопасен в применении для слизистых оболочек млекопитающих. По Hodge и Sterner и классификации К.К. Сидорова субстанция лецитина биотехнологического может быть отнесена к практически нетоксичным препаратам LD₅₀>5000 мг/кг.

Ключевые слова: раздражающая активность, острая токсичность, лецитин.

Высококачественный лецитин представляет собой смесь фосфолипидов, состоящую из холина, инозитола и фосфатидов. Эти компоненты относятся к группе важнейших нутриентов питания, дефицит которых является серьезной проблемой для здоровья абсолютно числа населения. Особую опасность представляет недостаток лецитина в диете у детей раннего возраста, что особенно сказывается при искусственном вскармливании ребенка, ведь грудное молоко матери является единственным источником лецитина для младенца [4, 9, 10].

Длительное время добавление липидов в парентеральном питании рассматривалось исключительно как источник энергии и способ предупреждения или коррекции дефицита незаменимых жирных кислот [8].

Такое одностороннее использование лецитина позволило сделать предположение о том, что недооценены фармакологические свойства ценного метаболического корректора и средства заместительной терапии. Необходимо

эмпирическое обоснование и научное подтверждение с помощью экспериментального моделирования патологического состояния лабораторных животных возможности применения лецитина как средства комплексной нейропротекторной и кардиопротекторной терапии. Учитывая химический состав лекарственных форм лецитина и комплексных лекарственных средств, содержащих лецитин в качестве вспомогательного компонента, целесообразно изучение определения у лецитина индивидуальной фармакологической активности с целью расширения фармакодинамических параметров.

Цель исследования: изучение безопасности применения биотехнологического лецитина в сравнении с лецитином растительного и животного происхождения. Для определения дозировки и кратности субстанции, для возможности длительного применения субстанции, предложенной для наполнения капсул, необходимо сначала определить степень безопасности: раздражающее действие и токсичность.

Материалы и методы

Эксперимент начали с изучения влияния лецитина на острую токсичность и раздражающее действие.

Опытные группы животных принимали изучаемый лецитин, полученный биотехнологическим методом. Контрольной группе животных вводили в эквивалентном объеме 0,9% раствор натрия хлорида. В эксперименте использованы лецитин растительный (соевый) (Фирма Lipoid GmbH Германия); лецитин животного происхождения (яичный) 10%.

Так как гранулы лецитина яичного трудно растворимы в спирте и нерастворимы в воде, мы в своих опытах использовали тонкие суспензии, полученные путем солюбилизации в твин-80, относящимся к неионогенным поверхностно-активным веществам (НПАВ). По химическому составу он представляет собой Сорбитан-полиоксиэтиленмоноолеат, имеет значение гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) равное 14,6 [2].

Установлено, что для НПАВ летальные дозы составляют от 3 до 50 г/кг массы человека [2, 7]. Из всех ПАВ наименее токсичны НПАВ, поскольку они плохо всасываются в кожу и не обладают резорбтивным действием [2]. Острая токсичность и местно-раздражающее действие их повышается с увеличением степени оксипилирования.

Раствор готовили в керамической ступке путем растирания субстанций лецитина с твин-80 и последующим добавлением при перемешивании 0,9% раствора натрия хлорида. При анализе некоторых работ выявлено, что для модифицирования вспомогательных веществ характерен эмпирический подход к их дозировке [2, 7].

Вещество вводили животным мето-

дом принудительного зондирования в теплом (37°C) виде [8].

В эксперименте принимали участие морские свинки массой 380-420 г и белые неимбредные мыши массой 20-22 г.

Животные выращены в питомнике ПятГФА, (г. Пятигорск), содержались на стандартном режиме вивария: температура окружающего воздуха 22±2,0°C, 12-ти-часовой синхронизированный световой режим, комбинированный корм и вода *ad libitum* [5].

Целью исследования фармакологического вещества на модели хорион-аллантаоисной оболочки куриного эмбриона явилось предварительное определение его возможного раздражающего действия на слизистые оболочки млекопитающих.

Результаты и их обсуждение

Оценку раздражающего действия проводили с помощью теста на хорион-аллантаоисной оболочке куриного эмбриона, HET-CAM test, продолжали испытания на животных по схеме, используемой в настоящее время в Германии (Spielmann и соавт., 1996), на слизистой оболочке глаза морских свинок *Guinea pigs* [6].

Результаты раздражения конъюнктивы млекопитающих регистрировали в баллах по 5-бальной шкале, согласно рекомендациям П. Михайлова (1985 г.). В данном случае контролем служил второй глаз животного [3].

Действие вещества оценивали в течение определенного периода времени по наличию или отсутствию воздействия на хорион-аллантаоисную оболочку под нанесенной каплей раствора тестируемого вещества. Полученные результаты позволяли предположить, что тестируемые субстанции могут не обладать раздражающим действием на слизистые оболочки млекопитающих (табл. 1).

Показатели раздражающего действия лецитина в тесте HET-CAM

Препарат	Класс соединений по степени раздражения		
	Разведение 1:1	Разведение 1:2	Разведение 1:4
ЛБТ	1,7 умеренная	1,0 отсутствие раздражения	1,0 отсутствие раздражения
ЛС	1,7 умеренная	1,0 отсутствие раздражения	1,0 отсутствие раздражения
ЛЯ	2,0 умеренная	1,0 отсутствие раздражения	1,0 отсутствие раздражения

Примечание: степень раздражения 4 класс – сильная; 3 класс – умеренная; 2 класс – слабая; 1 класс – отсутствие раздражения. ЛБТ – лецитин биотехнологический; ЛС – лецитин соевый; ЛЯ – лецитин яичный.

При нанесении лецитина биотехнологического (ЛБТ) в разведении 1:1 в двух случаях из трех наблюдалось небольшое покраснение хорион-аллантаоисной оболочки, замедление тока крови, что позволило согласно классификации веществ по степени раздражения отнести ко 2-му классу соединений. В трех случаях исследований в разведениях 1:2 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаоисной оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения.

В трех случаях исследований в разведениях 1:4 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаоисной оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения и свидетельствует о наименьшем раздражающем действии лецитина БТ.

При нанесении лецитина растительного соевого (ЛС) разведение 1:1 в двух случаях из трех отмечалось покраснение хорион-аллантаоисной оболочки, замедление тока крови, что позволило согласно классификации веществ по степени раздражения отнести субстанцию ко 2-му классу соединений. В трех случаях исследований в разведениях 1:2 не наблюдалось

никаких изменений хорион-аллантаоисной оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения. В трех случаях исследований в разведениях 1:4 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаоисной оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения.

При нанесении лецитина яичного (ЛЯ) в разведении 1:1 в трех случаях из трех наблюдалось покраснение хорион-аллантаоисной оболочки, что позволило согласно классификации веществ по степени раздражения отнести ко 2-му классу соединений. В трех случаях исследований в разведениях 1:2 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаоисной оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения. В трех случаях исследований в разведениях 1:4 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаоисной оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения.

Исследования по раздражающему действию было продолжено *in vivo* на слизистой оболочке глаза морских свинок. Изучали лецитин биотехнологический (опыты 1-3), растительный (опыты 4-6) и яичный (опыты 7-9) (табл. 2).

Таблица 2

Оценка раздражающего действия комплекса облепихового масла на конъюнктиве морских свинок

№ опыта	действие	отек (n=3)		гиперемия (n=3)	
		30 секунд	2 минуты	30 секунд	2 минуты
Лецитин биотехнологический					
1.		0	1	1	1
2.		0	1	0	1
3.		1	1	1	1
Лецитин растительный соевый					
4.		0	2	1	2
5.		0	2	1	1
6.		1	1	1	2
Лецитин яичный					
7.		0	2	1	1
8.		0	1	1	1
9.		1	1	1	2

Примечание: раздражающее действие 0-2 балла – слабое; 3-5 баллов – умеренное; 6-8 баллов – сильное. Опыты 1, 2, 3 – ЛБТ; 4, 5, 6 – ЛР; 7, 8, 9 – ЛЯ.

При нанесении лецитина биотехнологического через 30 с отек составил 0,33 баллов, гиперемия — 0,67, в сумме 1 балл – слабое раздражающее действие. Через две мин отек 1 балл, гиперемия — 1 балл, в сумме 2 балла – слабое раздражающее действие.

При нанесении лецитина растительного соевого на 30-й с отек — 0,33, гиперемия — 1 балл, в сумме 1,33 – слабое раздражающее действие. На 2-й мин 1,67 отек и гиперемия, в сумме 3,33 – умеренное раздражающее действие. Максимальное значение наблюдалось в опыте № 4: отек через две мин составил 2 балла и гиперемия — 2 балла, в сумме 4 балла, что соответствует умеренному раздражению.

При нанесении лецитина яичного отек через 30 с составил 0,33 балла, гиперемия — 1 балл, в сумме 1,33 – слабое раздражающее действие. Через две мин отек и гиперемия по 1,33, в сумме 2,67, что со-

ответствует умеренному раздражающему действию.

Экспериментальные данные позволили сделать вывод о том, что лецитин биотехнологический и яичный при применении на слизистую оболочку обладают слабым раздражающим действием, лецитин растительный — умеренным раздражающим действием. Все три вида сравниваемых между собой лецитина безопасны по действию на слизистые оболочки млекопитающих и допущены к дальнейшим исследованиям на млекопитающих.

Изучение острой токсичности лецитина проводили согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (под редакцией В.П. Фисенко) с определением LD₅₀ [6].

Критериями оценки острой токсичности служили картина интоксикации и выживаемость животных в течение 48 ч. Дальнейшее наблюдение проводили в

Таблица 3

Определение острой токсичности лецитина биотехнологического на мышах

Результат	Доза, мг/кг				
	100	500	1000	2000	5000
Кол-во животных	6	6	6	6	6
Выжило	6	6	6	6	6
Погибло	0	0	0	0	0
Z	-	0	0	0	0
D	-	400	500	1000	3000
DZ	-	0	0	0	0

$$m=6; LD_{50} = LD_{100} - \frac{\sum(dZ)}{m}; LD_{50} > 5000 \text{ мг/кг}$$

Примечание: Z – показатель разницы между количеством погибших животных при использовании двух соседних доз; D – показатель разницы между количеством двух соседних доз.

Таблица 4

Определение острой токсичности лецитина яичного на мышах

Результат	Доза мг/кг				
	100	500	1000	2000	5000
Кол-во животных	6	6	6	6	6
Выжило	6	6	6	6	6
Погибло	0	0	0	0	0
Z	-	0	0	0	0
D	-	400	500	1000	3000
DZ	-	0	0	0	0

$$m=6; LD_{50} = LD_{100} - \frac{\sum(dZ)}{m}; LD_{50} > 5000 \text{ мг/кг}$$

Примечание: Z – показатель разницы между количеством погибших животных при использовании двух соседних доз; D – показатель разницы между количеством двух соседних доз.

течение 2-х недель, причем в первые 6 ч после введения мышам находились под непрерывным наблюдением [1]. При изучении острой токсичности субстанций лецитина вводили вещество в разных дозах. Для определения нагрузки на организм животного максимальным объемом жидкости проводили параллельные исследования с использовани-

ем физиологического раствора в эквивалентном объеме [6].

Все субстанции лецитина вводили в дозировке 100; 500; 1000; 2000; 5000 мг/кг, методом принудительного зондирования *per os* в теплом (37,0±0,1°C) виде. Результаты исследований по изучению острой токсичности на мелких лабораторных животных (мышах) приведены в

табл. 3, 4. В первые минуты после введения лецитина биотехнологического и лецитина растительного в дозе 2000 мг/кг и 5000 мг/кг у мышей наблюдалось некоторое снижение двигательной активности и потребления воды и пищи. В течение 6 ч после введения в указанных дозах отмечалось снижение реакции на раздражители. К окончанию первых суток все описанные явления прошли, и животные не отличались по внешнему виду и характеру поведения от животных контрольной группы (физиологический раствор). При введении лецитина животного происхождения существенных изменений в поведении животных отмечено не было. В течение дальнейших двух недель проводили наблюдения за двигательной активностью, наличием судорог, координацией движений, реакцией на раздражители, тонусом скелетной мускулатуры, дыханием, состоянием кожного покрова, шерсти и окраской видимых слизистых оболочек, потреблением воды и пищи. Достоверных заметных отклонений по сравнению с контрольной группой животных (физиологический раствор эквивалентно) не было выявлено.

Проведенные исследования позволили сделать вывод, что исследуемый лецитин биотехнологический и сравниваемые с ним лецитин растительный и животный, по Hodge и Sterner и классификации К.К. Сидорова, могут быть отнесены к практически нетоксичным препаратам [6].

Проведенные исследования на куриных эмбрионах и конъюнктиве морских свинок показали, что лецитин биотехнологический не обладает раздражающей активностью и безопасен в применении для слизистых оболочек млекопитающих. По Hodge и Sterner и классификации К.К. Сидорова субстанция лецитина

биотехнологического может быть отнесена к практически нетоксичным препаратам $LD_{50} > 5000$ мг/кг.

Выводы

1. По данным эксперимента, проведенного на куриных эмбрионах, выявлено, что лецитин биотехнологический обладает слабой раздражающей активностью. В сравнении с лецитином растительного и животного происхождения установлено наименьшее раздражающее действие лецитина биотехнологического.

2. По данным эксперимента, проведенного на конъюнктиве морских свинок, лецитин биотехнологический через 30 с и на 2-й мин эксперимента проявил слабое раздражающее действие. Лецитин растительный на 30-й с проявил слабое раздражающее действие, на 2-й мин — умеренное раздражающее действие. Лецитин яичный через 30 с проявил слабое раздражающее действие, через две мин умеренное раздражающее действие.

3. Результаты по определению острой токсичности, исследованной на мышах методом Кербера, показали 100% выживаемость животных при введении всех видов лецитина в дозах 100, 500, 1000, 2000, 5000 мг/кг; $LD_{50} > 5000$ мг/кг, что соответствует 5-му классу соединений — практически нетоксичным препаратам.

Список литературы

1. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / В.В. Гацура. М.: Медицина. 1974. 141 с.
2. Коршунов В.А. Особенности сердечно-сосудистого действия антидепрессанта тетриндола: Дис. ... канд.фармац.наук. / В.А. Коршунов Пушино. 2000. 138 с.

3. Михайлов П. Медицинская косметика: пер. с болг. / П.Михайлов. М.: Медицина. 1985. 208 с.
4. Парентеральное питание в интенсивной терапии и хирургии. Методические рекомендации Министерства Здравоохранения и СР РФ. 2006.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под редакцией В.П. Фисенко. Москва. 2000. 398 с.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / В.П. Фисенко [и др.] М.: Медицина. 2000. С. 220-221.
7. Серебрякова З.Г. Поверхностно-активные вещества в производстве искусственных волокон / З.Г. Серебрякова М. Химия. 1986. 215 с.
8. Сернов, Л.Н. Элементы экспериментальной фармакологии. / Сернов Л.Н., Гацура В.В., М. 2000. 351с.
9. Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases, Сер. техн. докл. ВОЗ, ВОЗ, Женева. 1990. 797 с.
10. Pluess T., Hayoz D., Berger M. Intravenous fish oil the physiological response to endotoxin in healthy subjects. Intensive Care Med 2007. 33: P. 789-797.

Studying of sharp toxicity and irritating action of lecithin

A.K. Gusejnov, V.N. Karkishchenko, A.V. Sergienko, M.N. Ivashev

The conducted researches on chicken embryos and a conjunctiva of porpoises have shown that lecithin biotechnological doesn't possess irritating activity and is safe in application for mucous membranes of mammals. On Hodge and Sterner and K.K.Sidorov's classifications the substance of lecithin biotechnological can be carried to almost nontoxic preparations $LD_{50} > 5000$ mg/kg.

Key words: irritating activity, sharp toxicity, lecithin.

Изучение антикаталептической активности гимантана при различных путях введения и в комбинации с леводопой

Е.А. Иванова, А.В. Непоклонов, И.И. Кокшенев, И.Г. Капица,
Т.А. Воронина, Е.А. Вальдман

НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, Москва

Контактная информация: Елена Артуровна Вальдман evaldman@m9com.ru

На модели галоперидоловой каталепсии у крыс изучена антикаталептическая активность нового противопаркинсонического препарата гимантана при внутривенном введении и в комбинации с леводопой. Установлено, что гимантан при внутривенном введении оказывает выраженный эффект в дозе 5 мг/кг. Комбинированное применение гимантана с леводопой приводит к усилению эффекта леводопы.

На модели акинетического состояния, вызванного введением низкой дозы галоперидола (0,1 мг/кг) мышам C57BL/6 с паркинсоническим синдромом, индуцированным нейротоксином МФТП, установлено, что гимантан (5 мг/кг внутривенно) проявляет выраженные антикаталептический и антиакинетический эффекты.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, гимантан, леводопа, акинезия, дискинезия.

Гимантан, оригинальный отечественный препарат из группы производных адамантана, обладает высокой активностью и широким спектром антипаркинсонических эффектов, доказанными в экспериментах [1, 2, 4, 5, 6, 10].

В пилотном клиническом исследовании показана безопасность и эффективность гимантана в таблетированной лекарственной форме при его приеме в дозе 25 мг в сутки однократно для лечения ранних стадий болезни Паркинсона. Препарат рекомендован для дальнейшего клинического изучения, в том числе на поздних стадиях болезни Паркинсона [7].

Леводопа остается «золотым стандартом» симптоматического лечения болезни Паркинсона и назначается практически всем больным с поздними стадиями заболевания. Однако добиться полного восстановления моторных функций часто не удается, развиваются осложнения – различные типы дискинезий, требую-

щие изменения дозы леводопы, режима введения и добавления других препаратов [8, 9, 11]. Одним из самых тяжелых проявлений декомпенсации на поздних стадиях заболевания являются акинетические кризы, для купирования которых требуется парентеральное введение противопаркинсонических препаратов. В настоящее время в клинической практике существует только один препарат для инфузионного введения – производное адамантана – амантадина сульфат (ПК-Мерц) [12].

В ранее проведенных экспериментах показано, что совместное хроническое введение гимантана с леводопой не приводит к усилению побочного эффекта леводопы, и даже снижает скорость развития и тяжесть леводопа-индуцированных дискинезий (собственные данные – статья принята в печать). **Целью** настоящего исследования явилась оценка антикаталептического эффекта гимантана

при различных путях введения и возможности потенцирования терапевтического эффекта леводопы.

Материалы и методы

Исследования проводили на нелинейных белых мышах-самцах массой 25-30 г, мышах-самцах линии C57BL/6 массой 22-26 г и белых нелинейных крысах-самках массой 200-250 г (питомник «Столбовая» Московская область). В каждой группе было по 10 животных.

Каталепсию моделировали внутрибрюшинным введением нейролептика галоперидола мышам и крысам в дозе 1 мг/кг. В другой серии экспериментов галоперидол в дозе 0,1 мг/кг вводили мышам линии C57BL/6 через 48 ч после введения нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина гидрохлорида (МФТП) (30 мг/кг, внутрибрюшинно).

Исследуемые вещества – гимантан, мидантан (НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, Россия) и леводопу (Sigma-Aldrich, USA) – вводили одновременно с галоперидолом (Гедеон Рихтер, Венгрия). Животные контрольной группы получали дистиллированную воду.

У мышей антагонизм с галоперидолом оценивали по способности исследуемых веществ уменьшать выраженность каталептогенного состояния животных. Продолжительность каталепсии оценивали через 60 и 120 мин после введения веществ. Животное располагали у горизонтального стержня диаметром 0,5 см, закрепленного на высоте 4 см так, чтобы мышь опиралась на стержень обеими передними лапками (поза лектора). Попытки придать животному нужное положение продолжали не более 1 мин. Регистрировали время пребывания в неподвижном состоянии – «позе лектора» – в течение 2 мин.

Антикаталептические свойства изучаемых препаратов у крыс оценивали по методике Mogurgo и градуированной и альтернативной форме через 60 и 120 мин после введения галоперидола с использованием теста «параллельные стенки» и теста «ступеньки» [3]. При оценке на «параллельных стенках» передние и задние конечности животного помещали таким образом, чтобы спина животного была прямой. Попытки придать животному нужную позу продолжались не более 1 мин. Фиксировали время пребывания крысы в неподвижном состоянии. Оценивали общую продолжительность каталепсии, а также процент животных с каталепсией в группе. При альтернативном учете критерием наличия каталептического состояния считали пребывание в неподвижном состоянии на стенках в течение 45 сек.

При оценке каталепсии на ступеньках (высотой 8, 5 и 3 см) измеряли продолжительность застывания животного в непривычной позе, которую оценивали в баллах. Животное усаживали на задние лапки так, чтобы опираясь передней лапкой на ступеньку, крыса держала бы другую лапку без опоры. Удержание лапки в течение 40 и более с на верхней ступеньке оценивалось в 3 балла, на средней ступеньке – в 2 балла и на нижней – в 1 балл. Эти действия попеременно проводили с обеими передними лапами животного. Попытки усадить животное в нужную позу продолжали не более 1 мин. Далее считали сумму баллов для левой и правой лапы. Степень каталепсии оценивали в баллах по группе.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Данные представлены в виде Mean±SEM.

Таблица 1

Влияние гимантана при разных путях введения на каталепсию, вызванную галоперидолом

Вещество, доза, способ введения	Продолжительность застывания мышей в позе «лектора» после введения галоперидола, с	
	Через 60 мин	Через 120 мин
Контроль интактный, дист. вода	5,27±3,08	5,67±3,25
Галоперидол 1 мг/кг в/б + дист. вода	95,83±8,98#	108,33±9,01#
Гимантан 10 мг/кг в/б + Галоперидол 1 мг/кг в/б	40,0±3,54*	69,1±7,14*
Гимантан 5 мг/кг в/б + Галоперидол 1 мг/кг в/б	64,0±3,71*	78,5±5,11*
Гимантан 5 мг/кг в/в + Галоперидол 1 мг/кг в/б	42,0±3,21*	61,0±6,12*
Мидантан 20 мг/кг в/б + Галоперидол 1 мг/кг в/б	61,33±14,12*	95,0±13,29

Примечание: # – P<0,05 достоверность различий в сравнении с группой «Контроль интактный»; * – P<0,05 достоверность различий в сравнении с группой, которой вводили только галоперидол.

Таблица 2

Влияние гимантана на каталепсию у мышей C57BL/6 с паркинсоническим синдромом, вызванным введением нейротоксина МФТП

Вещества, дозы, способ введения	Продолжительность застывания мышей в позе «лектора» после введения малой дозы галоперидола, с	
	Через 60 мин	Через 120 мин
Контроль интактный, дист. вода.	2,6±1,67	23,6±11,75
МФТП 30 мг/кг в/б + Галоперидол 0,1 мг/кг в/б	14,8±4,41#	96,5±13,67#
Гимантан 5 мг/кг в/в + МФТП 30 мг/кг в/б + Галоперидол 0,1 мг/кг в/б	9,6±5,68	34,4±21,69*

Примечание: # – P<0,05 достоверность различий в сравнении с группой «Контроль интактный»; * – P<0,05 достоверность различий в сравнении с группой «МФТП + Галоперидол».

Результаты и их обсуждение

Галоперидол в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно вызывал каталепсию у 100% мышей. Гимантан в дозе 10 мг/кг (в/б) значительно снижал каталептогенный эффект галоперидола: время нахождения мышей в неудобной позе сократилось в 2,4 и в 1,57 раза через 1 ч и 2 ч после введения нейролептика соответственно. Эффект гимантана в дозе 5 мг/кг (в/б) был достоверно ниже. Гимантан при внутривенном введении в дозе 5 мг/кг проявлял выраженное антикаталептическое действие, равное эффекту препарата в дозе 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении. Через 1 ч после введения галоперидола эффект гимантана в дозе 10 мг/кг (в/б) был сопоставим с эффектом мидантана в дозе 20 мг/кг (в/б); через 2 ч антикаталептический эффект мидантана не регистрировался, а эффект гимантана оставался достоверным (табл. 1).

В следующем эксперименте моделировали акинетическое состояние у мышей линии C57BL/6 введением малой дозы галоперидола на фоне сформировавшегося МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома [16]. Введение галоперидола в дозе 0,1 мг/кг через 48 ч после МФТП приводило к развитию выраженной каталепсии у всех животных. Гимантан при внутривенном введении в дозе 5 мг/кг оказывал выраженный антиакинетический эффект, что характеризовалось достоверным сокращением времени застывания мышей в позе «лектора». Эффект гимантана был более выраженным через 2 ч после введения галоперидола (табл. 2).

Полученные результаты подтверждают выраженный антикаталептический

и антиакинетический эффект гимантана при внутривенном введении в дозе 5 мг/кг.

Оценка эффекта гимантана в комбинации с леводопой в низкой дозе (10 мг/кг) проводилась на крысах с использованием двух методик оценки каталепсии [3]. По данным ранее проведенных исследований леводопа даже в дозе 100 мг/кг не проявляла 100% эффект на модели галоперидоловой каталепсии [1].

В методике «параллельные стенки» гимантан в дозе 10 мг/кг в/б достоверно снижал продолжительность каталепсии у крыс через 60 мин. после введения галоперидола (1 мг/кг в/б). После введения леводопы (10 мг/кг в/б) зафиксирована лишь тенденция снижения времени застывания животных в неудобной позе и уменьшения числа животных с максимально выраженной каталепсией. Совместное введение гимантана (10 мг/кг в/б) и леводопы (10 мг/кг в/б) приводило к значительному усилению антикаталептического эффекта, продолжительность каталепсии была достоверно ниже как через 60, так и 120 мин после введения галоперидола по сравнению с группой, получавшей только галоперидол. На фоне комбинации гимантана с леводопой ни у одного животного не отмечалось каталепсии максимальной продолжительности, равной 120 с (табл. 3).

В методике оценки продолжительности застывания крыс в непривычной позе на ступеньках также зарегистрирован достоверный антикаталептический эффект гимантана (10 мг/кг) через 60 и 120 мин. после галоперидола, отсутствие достоверного эффекта леводопы (10 мг/кг) и значительное усиление антикаталептической активности при применении комбинации двух препаратов

Таблица 3
Антикаталептическое действие гимантана, леводопы, комбинации гимантана и леводопы у крыс в методике «параллельные стенки»

Группа, доза, способ введения	Продолжительность каталепсии, с		% крыс с каталепсией (120 с)	
	Время после введения галоперидола			
	60 мин	120 мин	60 мин	120 мин
Галоперидол 1 мг/кг в/б	74,78±18,0	103,0±12,08	55,56	77,78
Гимантан 10 мг/кг в/б + Галоперидол 1 мг/кг в/б	19,67±9,89*	75,33±21,28	0	50
Леводопа, 10 мг/кг в/б + Галоперидол 1 мг/кг в/б	36,67±18,03	69,17±23,05	16,67	50
Гимантан 10 мг/кг в/б + Леводопа 10 мг/кг в/б + Галоперидол 1 мг/кг в/б	6,33±3,43**	16,83±3,51**	0	0

Примечание: * – P<0,05 достоверность различий в сравнении с группой «Галоперидол»,
^ – P<0,05 достоверность различий в сравнении с группой «Гимантан+Галоперидол»,
– P<0,05 достоверность различий в сравнении с группой «Леводопа+Галоперидол».

Таблица 4
Влияние гимантана, леводопы, совместного введения гимантана и леводопы на продолжительность застывания крыс в тесте «ступеньки» после введения галоперидола

Группы (доза)	Оценка каталепсии в баллах	
	через 60 мин	через 120 мин
Галоперидол 1 мг/кг в/б	5,5±0,34	5,83±0,17
Гимантан 10 мг/кг в/б + Галоперидол 1 мг/кг в/б	1,33±0,99*	2,83±1,05*
Леводопа, 10 мг/кг в/б + Галоперидол 1 мг/кг в/б	2,83±1,28	3,67±1,2
Гимантан 10 мг/кг в/б + Леводопа 10 мг/кг в/б + Галоперидол 1 мг/кг в/б	0,33±0,33*	0±0**

Примечание: * – P<0,05 достоверность различий в сравнении с группой «Галоперидол»,
^ – P<0,05 достоверность различий в сравнении с группой «Гимантан+Галоперидол»,
– P<0,05 достоверность различий в сравнении с группой «Леводопа+Галоперидол».

– леводопы и гимантана, особенно выраженное через 120 мин после введения галоперидола (табл. 4).

Каталепсия, вызываемая нейролептиками, описывается как состояние, включающее в себя компоненты акинезии и мышечной ригидности, напоминающее симптоматику паркинсонического синдрома [15]. В этом состоянии нейрональные пути головного мозга, вовлеченные в осуществление произвольных движений, оказываются неактивными, в противоположность системам, обеспечивающим в контроль рефлекторного положения тела и поддержания равновесия [16]. Эта модель не отражает развивающиеся при паркинсонизме дегенеративные нарушения дофаминергических нейронов, однако позволяет судить о выраженности антикаталептической и антиакINETической активности изучаемых соединений.

В результате проведенных экспериментов показано, что гимантан при внутрибрюшинном и внутривенном введении обладает выраженным антикаталептогенным действием на модели галоперидоловой каталепсии, но при этом эффект внутривенного применения гимантана оказался выше, чем внутрибрюшинного. Полученные результаты указывают на то, что гимантан при внутривенном введении может применяться в меньшей дозе, и это необходимо учесть при разработке инъекционной лекарственной формы препарата.

К развитию акинетических кризов при болезни Паркинсона могут приводить факторы, связанные с нарушением программы фармакотерапии, в частности назначение пациентам препаратов, блокирующих дофаминовые рецепторы [13]. Подобное состояние было смоделировано введением галоперидола в малой дозе (не приводящей к развитию ката-

лепсии у интактных животных) мышам C57BL/6 с паркинсоническим синдромом, индуцированным однократным введением нейротоксина МФТП [17]. Малая доза галоперидола в условиях этой модели вызывала развитие выраженной каталепсии. На этой модели гимантан при внутривенном введении эффективно устранял акинетическое состояние.

Полученные в нашем исследовании результаты позволяют предполагать эффективность гимантана при внутривенном введении при акинезиях и обосновывают целесообразность разработки новой лекарственной формы гимантана для внутривенного введения.

Лечение поздних стадий болезни Паркинсона обязательно включает препараты леводопы. Однако развитие двигательных осложнений при терапии леводопой часто требует изменений режима ее применения и снижения ее дозы. При этом возможно снижение терапевтического эффекта препарата. Комбинация с другими противопаркинсоническими препаратами в идеале должна приводить к усилению основных эффектов без усиления побочного нежелательного действия. Совместно с леводопой обычно назначаются агонисты дофаминовых рецепторов, которые по разным данным могут оказывать как положительный эффект, так и сами вызывать дискинезии [11, 14]. Как было показано ранее, гимантан не усиливает и даже снижает скорость развития и тяжесть индуцированных леводопой дискинезий (собственные данные – статья принята в печать). В настоящем исследовании установлено, что совместное применение гимантана и леводопы приводит к потенцированию антикаталептического эффекта обоих препаратов. Таким образом, полученный результат свидетельствует в пользу потенциальной

эффективности использования леводопы в комбинации с гимантаном для лечения пациентов с поздними стадиями болезни Паркинсона. При дальнейшем клиническом изучении гимантана целесообразно провести оценку его эффективности в составе комбинированной терапии у пациентов с поздними стадиями заболевания.

Выводы

1. На модели галоперидоловой катаlepsии у мышей новый противопаркинсонический препарат гимантан (5 мг/кг внутривенно) оказывает выраженный антикатаlepsический эффект.

2. На модели акинетического состояния, вызванного введением низкой дозы галоперидола (0,1 мг/кг) животным с паркинсоническим синдромом, индуцированным нейротоксином МФТП, гимантан (5 мг/кг внутривенно) проявляет выраженные антикатаlepsический и антиакинетический эффекты.

3. Комбинированное применение гимантана с леводопой приводит к усилению эффекта леводопы.

Список литературы

1. Вальдман Е.А. Фармакологическая активность нового производного адамантана - потенциального противопаркинсонического препарата при субхроническом введении // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2000. № 5. С. 3-6.
2. Вальдман Е.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Противопаркинсоническая активность нового производного адамантана // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999. № 4. С. 3-7.
3. Воронина Т.А., Вальдман Е.А., Неробкова Л.Н. Методические указания по изучению антипаркинсониче-

ско активности фармакологических веществ // В кн.: Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ. - М.: Медицина. 2005. С. 295-307.

4. Воронина Т.А., Авакян Г.Н., Катунина Е.А., Вальдман Е.А., Неробкова Л.Н., Самойлова Е.В. Сравнительное изучение нейрофизиологических эффектов препаратов группы адамантана на экспериментальной модели паркинсонизма // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2004. № 2. С. 16-18.
5. Елшанская М.В., Соболевский А.И., Вальдман Е.А., Ходоров Б.И. Взаимодействие потенциального противопаркинсонического средства производного адамантана с ионными каналами глутаматных рецепторов NMDA подтипа // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2001. 64 (1). С. 18-21.
6. Капица И.Г., Неробкова Л.Н., Вальдман Е.А., Воронина Т.А., Шаркова Л.М. Электрофизиологический анализ эффектов гимантана на модели паркинсонического синдрома, вызванного нейротоксином МФТП+ // Психофармакология и биологическая наркология. 2005. № 1. С. 822-827.
7. Катунина Е.А., Петрухова А.В., Авакян Г.Н., Вальдман Е.А., Неробкова Л.Н., Воронина Т.А., Саядян Х.С. Возможности применения гимантана при лечении болезни Паркинсона // Журнал Неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. 2008. 108(6). С. 24-2.
8. Катценшлагер Р., Лиз Э.Дж. Лечение болезни паркинсона: леводопа - препарат первого выбора // J Neurol. 2002. № 249 (Suppl 2): II/19-II/24.
9. Левин О.С. Леводопа и леводопо-

фобия // Неврологический журнал. 2010. № 4. С. 4-11.

10. Неробкова Л.Н., Е.А.Вальдман, Воронина Т.А., Маркина Н.В., Шаркова Л.М. Влияние нового производного адамантана А-7 на проявления паркинсонического синдрома, вызванного системным введением нейротоксина МФТП // Эксперим. и клинич. Фармакология. 2000. 63(3). С. 3-6.
11. Преображенская И.С. Анализ возможности развития дискинезии у пациентов с болезнью Паркинсона при назначении агонистов дофамина пролонгированного действия // Русский медицинский журнал. 2010. № 16. С. 992-997.
12. Федорова Н.В., Грачев И.С. Леводопиндуцированные дискинезии при болезни Паркинсона: эффективность амантадиа сульфата // Неврологический журнал. 2009. № 1. С. 43-48.
13. Фёдорова Н.В., Чигирь И.П., Кулуа Т.К. Алгоритм лечения развернутых стадий болезни Паркинсона // Атмос-

фера. Нервные болезни. 2006. № 1. С. 20-26.

14. Brodsky M.A., Park B.S., Nutt J.G. Effects of dopamine agonist on the pharmacodynamics of levodopa in Parkinson disease // Arch. Neurol. 2010. 67 (10). P. 27-32.
15. Sanberg P.R. Haloperidol-induced catalepsy is mediated by postsynaptic dopamine receptors // Nature. 1980. 284. P. 472-473.
16. Wiecki T.V., Riedinger K., von Ameln-Mayerhofer A., Schmidt W.J., Frank M.J. A neurocomputational account of catalepsy sensitization induced by D2 receptor blockade in rats: context dependency, extinction, and renewal // Psychopharmacology (Berl). 2009. 204(2). P. 265-277.
17. Weihmuller F.B., Hadjiconstantinou M., Bruno J.P., Neff N.H. Administration of GM1 ganglioside eliminates neuroleptic-induced sensorimotor deficits in MPTP-treated mice // Neuroscience Letters. 1988. 92 (2). P. 207-212.

Study of anticatalepsic activity of hemantane using different routs of drug administration and in combination with levodopa

Е.А. Ivanova, A.V. Nepoklonov, I.I. Kokshenev, I.G. Kapitsa, T.A. Voronina, E.A. Valdman

Effects of intravenous administration of the novel antiparkinsonian drug hemantane and the combination of hemantane with levodopa were assessed on the model of catalepsy induced by haloperidol in rats. It was shown that catalepsy induced by haloperidol significantly antagonized by intravenous injection of hemantane 5 mg/kg. Combination of hemantane with levodopa increased the anticatalepsic activity of levodopa. Akinetic state was induced by low dose of haloperidol (0,1 mg/kg) in C57BL/6 with parkinsonian syndrome induced by neurotoxin MPTP. It was shown that hemantane 5 mg/kg, intravenous, had pronounced antiakinetetic and anticatalepsic activity on this model.

Key words: Illness of Parkinsona, gimantan, levodopa, akinesia, dyskinesia.

Об исследовании специфической активности, местнораздражающего действия, острой и хронической токсичности геля Ревесал

Е.К. Кречина, Л.Н. Герчиков, А.С. Григорьян, В.В. Наумова, Л.М. Демина

ЦНИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, Москва

Контактная информация: д.м.н., профессор Елена Константиновна Кречина
ekrechina@mail.ru

В опытах на животных проведено изучение геля Ревесал. Местноанестезирующая активность проявляется через 1-2 мин длительность эффекта составляет 45 мин. Введение перорально максимально допустимого объема препарата не оказывает токсического действия и не приводит к гибели мышей. Препарат обладает выраженной противовоспалительной активностью и ранозаживляющим действием.

Ключевые слова: гель Ревесал, токсичность, активность, раздражающее действие, безопасность.

Создание новых лекарственных форм противовоспалительного и обезболивающего действия определяется требованиями современной клинической практики к широкому ассортименту лекарственных средств для местного применения, обеспечивающих достаточный анестезирующий и противовоспалительный эффект [2, 3, 4, 5]. Несмотря на значительные успехи в области изучения этиологии и патогенеза пародонта, вопросы комплексной терапии с использованием средств общего и местного применения остаются весьма актуальными [1, 7].

При разработке состава геля во внимание были приняты следующие принципы: основа должна равномерно наноситься на слизистую оболочку, обладать оптимальными структурно-механическими свойствами, стабильностью, легко воспринимать и высвобождать лекарственное вещество, а также иметь приятный внешний вид и консистенцию. Таким образом, в качестве основных компонентов геля были взяты экстракт корня ревеня, кислота салициловая, спирт этиловый 95%, лидокаин 3%.

Материалы и методы

Исследования *противовоспалительной активности* проводили на модели язвенно-некротического процесса слизистой оболочки полости рта у 8 кроликов породы Шиншилла массой 2,0-2,5 кг [6]. Термическое поражение слизистой оболочки в области переходной складки у верхних резцов наносили штопфером, с длительностью воздействия – 40 с.

Животных разделяли на 2 группы по 4 особи в каждой: 1-я группа — опытная, 2-я — контрольная. Животным опытной группы проводили лечение гелем Ревесал, который ежедневно наносили на пораженный участок слизистой на 10 мин в течение 12 дней. Животные контрольной группы лечения не получали. О характере воспалительной реакции и динамике заживления ран судили визуально при ежедневном осмотре в сравнении с контролем. В конце эксперимента было проведено *гистологическое исследование*.

Специфическую анестезирующую активность геля Ревесал при поверхностной анестезии определяли на роговице глаза кролика по методу Ренье (4 кролика).

Гель в количестве 10, 30, 40, 50 мг вносили в конъюнктивальный мешок с помощью стеклянного шпателя. Было проведено изучение *острой токсичности* геля Ревесал. Опыты проводились на 20 беспородных мышях массой 22-25 г. Препарат вводили перорально.

Результаты и их обсуждение

При дозе 10 мг полная анестезия наступает на 3-й мин и длится не более 15 мин. При дозе 30 мг эффект наступает на 2-й мин и длится 20 мин. Индекс Ренье равен 813,5. При дозе 40 мг полная анестезия наступает на 1-й мин и длится 45 мин, индекс Ренье равен 1217,1, увеличение дозы до 50 мг не приводит к усилению эффекта. При этом не было отмечено гиперемии конъюнктивы и других слизистых оболочек глаза, что свидетельствует об отсутствии у геля Ревесал местнораздражающего действия. Установлено, что *местноанестезирующая активность* проявляется через 1-2 мин, длительность эффекта составляет 45 мин.

Было проведено изучение *острой токсичности* геля Ревесал. После введения геля в объеме 0,3 мл животные были несколько подавлены, малоподвижны, но признаков интоксикации не наблюдали. Через 1-2 ч их состояние нормализовалось. После введения препарата в объеме 0,4 мл угнетенное состояние мышей было выражено сильнее. Через 1,5-2 ч состояние их улучшалось, а через сутки эти явления исчезли. Далее объем вводимого препарата увеличили до 0,5 мл – максимально допустимого объема для перорального введения мышам. Было установлено, что такое ведение препарата не оказывает токсического действия и не приводит к гибели мышей.

Характер воспалительной реакции и динамика заживления ран в опытных

группах в течение первых 4-5 суток существенно не отличалась от контрольной. Однако уже на 6-7 сут картина изменилась. При визуальном наблюдении в опытных группах воспалительные явления были выражены в меньшей степени, чем в контрольной. Существенной разницы в поведении и лечебном действии у животных 1-й и 2-й группы отмечено не было, за исключением того, что животные 2-й группы начинали поедать корм на 3-й день применения препарата активнее, чем животные 1-й группы, что можно объяснить местноанестезирующим действием геля. По данным гистологического исследования, в конце эксперимента (на 11-й день) можно было наблюдать в опытных группах микродефект эпителия слизистой на месте ожога, дно которого образовано грубоволокнистой соединительной тканью, и один гиперемизированный сосуд в поле зрения (рис. 1). В это же время в контрольной группе наблюдался обширный язвенный дефект на месте поражения (рис. 2).

Было установлено, что заживление раны в опытных группах значительно опережает процесс восстановления тканей в контрольной группе. Таким образом, проведенное исследование показывает, что гель Ревесал обладает высоким противовоспалительным, ранозаживляющим и местноанестезирующим действием, не токсичен и может быть предложен для применения в стоматологической практике для лечения воспалительных заболеваний слизистой оболочки и тканей пародонта.

Список литературы

1. **Вилкова М.Г.** Лечение воспалительных заболеваний пародонта препаратами пихты: Автореф. дис... канд. мед. наук. Ставрополь. 2005. 22 с.
2. **Григорьян А.С., Грудянов А.И., Ра-**

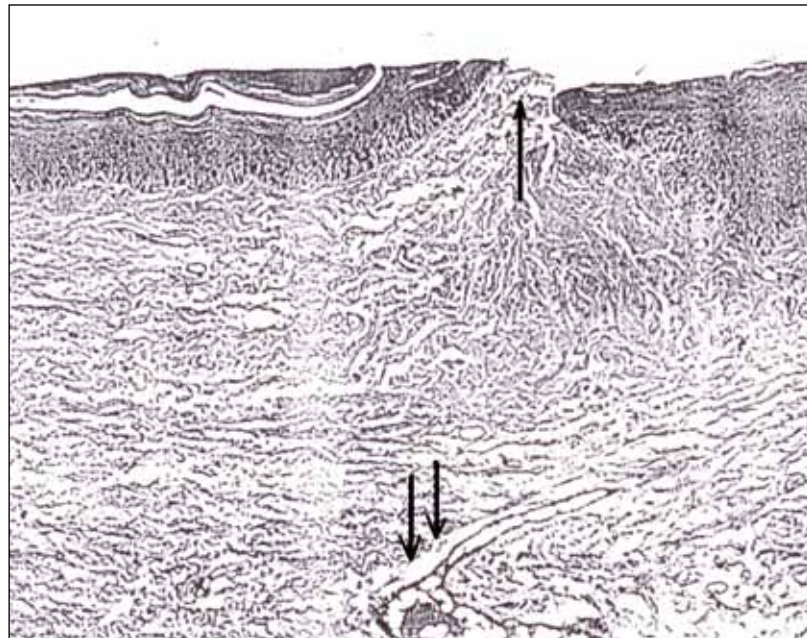


Рис. 1. Микрофотограмма. Микродефект эпителиального покрова слизистой оболочки (одинарная стрелка). Его дно образовано грубоволокнистой соединительной тканью. Виден гиперемированный сосуд в собственно слизистой (двоенные стрелки).

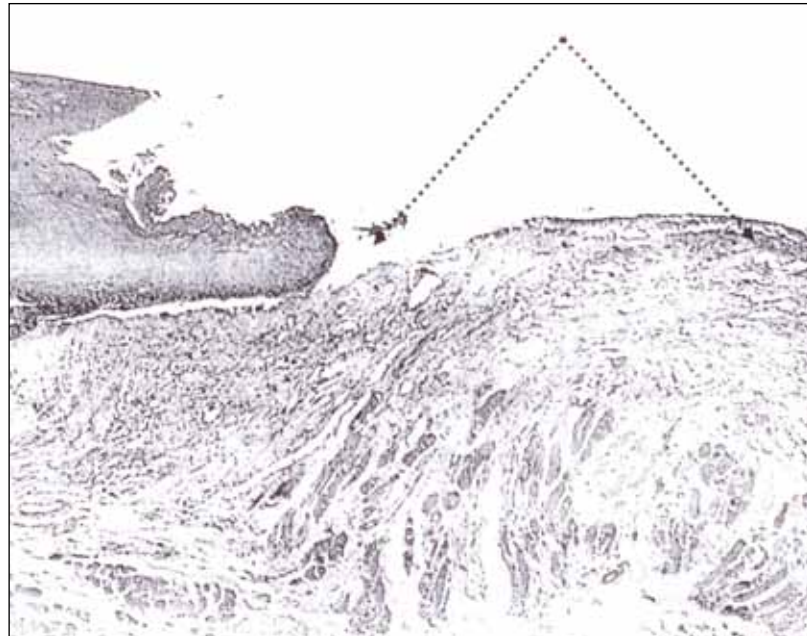


Рис. 2. Микрофотограмма. Обширный дефект эпителия (стрелки углом). Дно язвенного дефекта образовано богатой сосудами капиллярного типа грануляционной тканью, плотно инфильтрированной лейколимфомакрофагальными элементами.

- бухина Н.А. и др.* Болезни пародонта. М.: МИА. 2004. 320 с.
3. *Григорьян А.С., Фролова О.А.* Морфофункциональные основы клинической симптоматики воспалительных заболеваний пародонта // *Стоматология.* 2006. № 3. С. 11-17.
 4. *Дмитриева Л.А.* Современные аспекты клинической пародонтологии. М., МЕДпресс. 2001. 128 с.
 5. *Дмитриева Л.А., Царев В.Н., Носик А.С. и др.* Клинико-микробиологическая оценка эффективности применения хлоргексидин-содержащих форм «Элюдрил», «Пародиум» и «Эльгидиум» в комплексном лечении пародонтита: Метод. пособ. для врачей-стом. М. 2003. 32 с.
 6. *Несин А. Ф.* Лечение ЯН поражений слизистой оболочки полости рта мексанамина натриевой солью: автореф. дис...канд. мед. наук. Киев. 1979. 22 с.
 7. *Орехова Л.Ю., Тэц В.В., Улитовский С.Б. и др.* Использование адгезивного бальзама «Асепта» при лечении воспалительных заболеваний пародонта // *Пародонтология.* 2007. № 3 (44). С. 3-7.

About of the study specific activity, local irritating action, acute and chronic toxicity of the gel Revesal

E. K. Krechina, L.N. Gerchikov, A.S. Grigorian, V.V. Naumov, L.M. Demina

In experiments on animals have been spent studying of the specific activity, irritating action and toxicity of gel Revesal structure. It has been established that anesthetizing activity is shown through 1-2 minutes, duration of effect makes 45 minutes. Gel Revesal possesses the expressed antiinflammatory activity and healing action.

Key words: gel Revesal, toxicity, activity, irritating.

Анализ кардиопротекторного влияния небиволола на ультраструктуру миокарда при регенераторно-пластической сердечной недостаточности у крыс

Ю.Н. Кротова, Д.П. Хлопонин, П.А. Хлопонин, Т.В. Архипова

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Контактная информация: д.м.н. Хлопонин Дмитрий Петрович khloponin@list.ru

Пролонгированное курсовое введение адриамицина — антибиотика из ряда производных антрациклинов — индуцирует у крыс выраженную кардиотоксическую реакцию с развитием характерной картины кардиомиопатии и регенераторно-пластической сердечной недостаточности. Кардиоселективный β_1 -адреноблокатор небиволол проявляет на данной модели сердечной недостаточности отчетливую кардиопротекторную активность. В пользу этого свидетельствуют существенное уменьшение выраженности процессов клеточной гибели (главным образом, апоптоза) кардиомиоцитов, демонстрируемая в большинстве сердечномышечных клеток отсроченная активация процессов внутриклеточной регенерации, структурная стабилизация компонентов гистогематического барьера и снижение проявлений внутриклеточного и, особенно, интерстициального отека.

Ключевые слова: небиволол, β -адреноблокатор, кардиопротекция, адриамицин, сердечная недостаточность, апоптоз.

Антибиотики — производные антрациклинового ряда, такие как адриамицин (АДР, доксорубин), даунорубин, эпирубин, идарубин — одни из наиболее эффективных современных антибластомных средств, широко используемых для моно- и полихимиотерапии различных форм ряда опухолей, включая солидные опухоли, саркомы мягких тканей, лейкозы [3, 4, 5, 6, 11].

Однако их применение существенно ограничено возникающими нежелательными эффектами, основным из которых является дозозависимая кардиотоксичность, приводящая к развитию кардиомиопатии и тяжелой хронической сердечной недостаточности (СН), которые де-факто резистентны ко всем известным сегодня фармакотерапевтическим средствам [4, 8, 10, 11].

Патогенетические механизмы антрациклиновой кардиотоксичности крайне

сложны и многоплановы. Приоритетными среди них ныне считаются активация ПОЛ, нарушение адренергической иннервации и синтеза сократительных белков, развитие иммуновоспалительной реакции и стимуляция процессов клеточной гибели (включая апоптоз кардиомиоцитов (КМЦ)) в миокарде [4, 6].

Достигнутые за последние годы определенные (но, честно признать, довольно скромные) успехи в плане фармакопрофилактики и терапии АДР-индуцированной кардиотоксичности связаны, в том числе, с применением лекарственного препарата из ряда β -адреноблокаторов (БАБ) — карведилола [4, 6, 7]. На основании этих данных и продемонстрированного нами на модели альтернативной СН кардиопротекторного эффекта у кардиоселективного БАБ с NO-модулирующей активностью небиволола, мы посчитали

рациональным провести ультраструктурный анализ влияния этого БАБ на миокард крыс с экспериментальной регенераторно-пластической СН антрациклинового генеза.

Материалы и методы

Исследования проводились на 24 белых беспородных крысах-самцах массой 150-180 г (на начало эксперимента), полученных из филиала «Андреевка» НЦБМТ РАМН. Животные содержались в стандартных условиях вивария (при естественном освещении, t воздуха $+18-20^\circ\text{C}$ и влажности 50-60%) в пластиковых клетках размером $55 \times 45 \times 15$ см, с подстилкой из древесных опилок, по 4-6 особей в клетке. Крысы потребляли гранулированный комбикорм (производитель ООО «Лабораторснаб») и воду *ad libitum* в поилках объемом 200 мл. В эксперимент животных забирали после 7 дней карантина.

Регенераторно-пластическую СН у животных моделировали в соответствии с общепринятым протоколом [12] путем введения АДР («Доксорубин-Лэнс», «Лэнс-Фарм», Россия) в курсовой дозе 15 мг/кг внутривенно (группа А, $n=6$). Раствор АДР готовили согласно инструкции фирмы-производителя, растворяя содержимое 1 флакона (10 мг) в 5 мл растворителя (0,9% изотонического раствора NaCl).

Животные, служившие в качестве контроля I уровня (K_0 -группа, $n=6$), вместо АДР в аналогичном режиме (6-кратно в течение 2 недель) и в сравнимом объеме получали в/б инъекции 0,9% изотонического раствора NaCl.

Основная (опытная) группа животных (группа Н, $n=6$) параллельно с АДР (вводившимся в курсовой дозе и режиме,

аналогичных группе А) в течение всего срока наблюдения получала кардиоселективный БАБ небиволол (Н) («Небилет», Berlin-Chemie AG, Германия) в суточной дозе 1 мг/кг *per os*. Введение Н начинали за двое суток до 1-й инъекции АДР, производили ежедневно и прекращали за 24 ч до умерщвления животных.

В группе контроля II уровня (K_{II} ; $n=10$) АДР крысам не вводился, и они получали только Н в режиме, аналогичном группе Н (в дозе 1 мг/кг/сут *per os*).

Забор экспериментального материала (миокарда) производили на 8-9 неделях эксперимента. Для ультраструктурного анализа забирали по 3 сердца крыс из каждой группы. Обработка материала проводилась согласно общепринятым протоколам. Извлеченные сердца промывали в холодном 0,1 моль/л буферном растворе фосфата натрия ($\text{pH}=7,4$). Далее образцы ткани предсердий и левого желудочка в форме кусочков размером 1×1 мм фиксировали в холодном 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере ($\text{pH}=7,4$) с последующей постфиксацией 1% раствором тетраоксида осмия. Материал промывали в холодном растворе фосфатного буфера, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в аралдит. Полимеризацию блоков производили ступенчато при $t=48^\circ\text{C}$, 59°C и 80°C . После прицельной заточки блоков ультратонкие срезы (50-90 нм) изготавливали на ультрамикротоме LKB-8800. Срезы контрастировали в 2,5% спиртовом растворе уранил-ацетата [13, 14] и растворе цитрата свинца [9], а затем просматривали в просвечивающем электронном микроскопе Tecnai G2 Spirit Bio TWIN с системой фотосъемки Tecnai Plate Camera System и цифровой видеокамерой высокого разрешения SIS MegaView III.

Результаты и их обсуждение

Картина АДР-индуцированной кардиомиопатии и СН характеризуется демонстративными изменениями ультраструктуры миокарда, которые представляют собой комплекс морфологических проявлений, вызванных адриамицином повреждений, с одной стороны, и ответных репаративных реакций, с другой.

Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов миокарда крыс ГРУ АДР в целом согласуется с имеющимися в литературе описаниями [1, 2]. Для развивающейся у животных регенераторно-пластической СН в отдаленные (8-9 недели) сроки эксперимента свойственна явная гетероморфность желудочковых и предсердных КМЦ, которая, несомненно, обусловлена вариабельностью в них характера инволюционных и репаративных сдвигов.

Определяющее значение в структурной перестройке сердечномышечной ткани имеет практически полное подавление внутриклеточных процессов биосинтеза (т.е. пластического обмена) как основы

обновления ультраструктур КМЦ. При этом КМЦ условно можно подразделить на три типа. В первых (немногочисленных) проявления угнетения синтеза РНК и белка незначительны, во вторых его пролонгированная блокада и низкая активность сопряжены с гипоплазией внутриклеточных структур, а третьим КМЦ присуще и вовсе абсолютное подавление синтеза РНК и белка, проявлением чего является их прогрессирующая атрофия и элиминация. Последняя происходит в том числе посредством апоптотической гибели клеток сердечной мышцы, интенсивность которой к концу 9 недели эксперимента достигала 0,2-0,3%.

К основным морфологическим проявлениям антрациклиновой кардиотоксичности относятся не только изменения электронной плотности «гелизация» цитоплазмы, ультраструктуры ядра и его компонентов, но и организации и соотношений внутриклеточных объемов органелл сократительного аппарата (миофибрилл), энергетического метаболизма (митохондрий) (рис. 1), биосинтеза (сво-

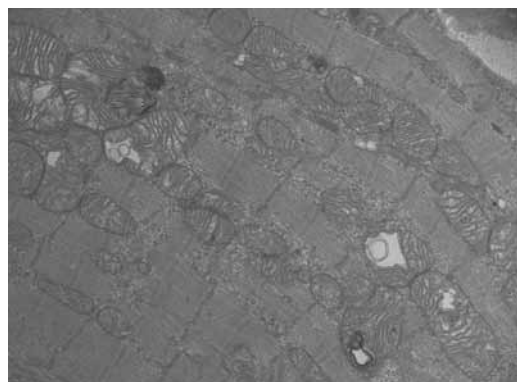


Рис. 1. Сократительный аппарат и деструктивно измененные митохондрии в кардиомиоцит правого предсердия крысы группы АДР. 9 неделя эксперимента. Электронная микрофотография. Ув. 11.500 х.

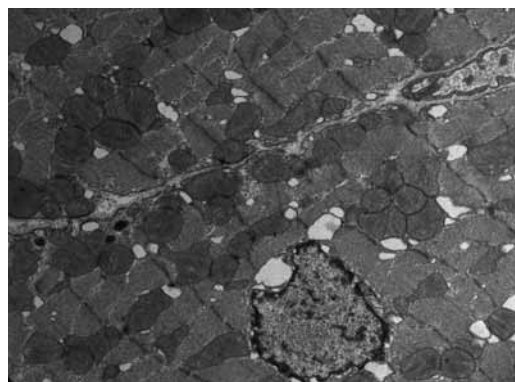


Рис. 2. Деструктивные изменения в кардиомиоцитах левого желудочка сердца крысы группы АДР. Дилатация цистерн саркоплазматической сети. 9 неделя эксперимента. Электронная микрофотография. Ув. 6.000 х.

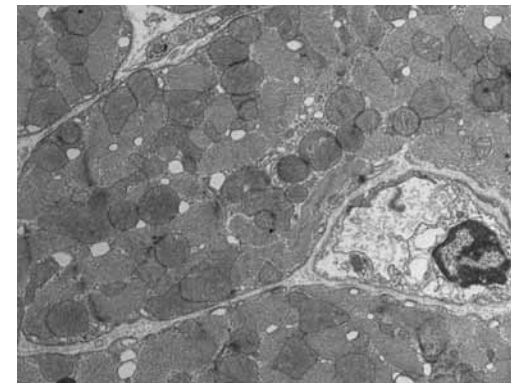


Рис. 3. Ультраструктурные проявления отека интерстициального компонента миокарда крыс группы АДР. 9 неделя эксперимента. Электронная микрофотография. Ув. 6.000 х.

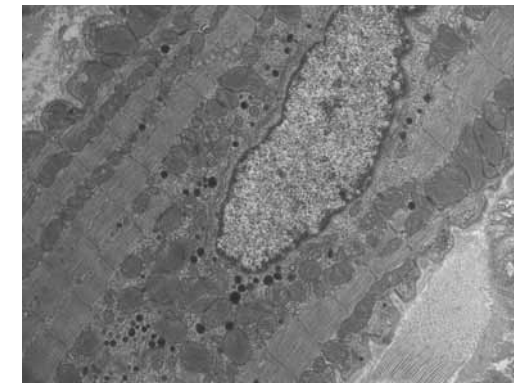


Рис. 4. Ультраструктура кардиомиоцита правого предсердия крысы группы Н. Продолжительность эксперимента – 9 недель. Ув. 6.000 х.

бодных рибосом, саркоплазматической сети (рис. 2) и аппарата Гольджи), включений (гранул гликогена и свободных липидов). Уже на обзорных электроннограммах отчетливо визуализируются проявления выраженного внутриклеточного и интерстициального отека (рис. 3). Последний, наряду с процессами структурной реорганизации интерстиция миокарда, обуславливает развитие интенсивного диффузного кардиосклероза, сопряженного с проявлениями апоптотической гибели эндотелиоцитов, лейомиоцитов и перицитов.

Анализ электроннооптических снимков миокарда крыс группы Н также свидетельствует о том, что АДР накладывает очевидный негативный «след» на структурно-функциональную характеристику сердечной мышечной ткани. Свидетельством этому служат явные изменения ультраструктуры вставочных дисков, ядерного компартмента КМЦ, миофибрилл, митохондрий и саркоплазматической сети. При этом весь комплекс развивающихся структурных изменений структуры в миокарде в целом характеризуется не только масштабом и

диапазоном проявлений деструктивных внутриклеточных процессов, но и определенной спецификой, присущей воздействию комбинации вводимых в эксперименте лекарственных препаратов (АДР и Н).

Использование Н оказывало несомненный стабилизирующий эффект на структуру сердечной мышечной ткани, основными проявлениями которого выступали не только значительное ослабление выраженности интерстициального и внутриклеточного отека, но и нормализация структуры гистогематического барьера в миокарде как вентрикулярного, так и атриального отделов сердца. Однако, необходимо, тем не менее, отметить, что в миокарде правого предсердия (рис. 4) выявленные особенности изменений его ультраструктуры на фоне Н были выражены не столь заметно как в левом желудочке (рис. 5).

Так или иначе, при введении Н достоверным было существенное (на 20-30%) уменьшение числа КМЦ с «адриамициновым» повреждением структуры ядер и особенно ядрышек; значительная гетерохроматизация кариоплазмы, отсут-

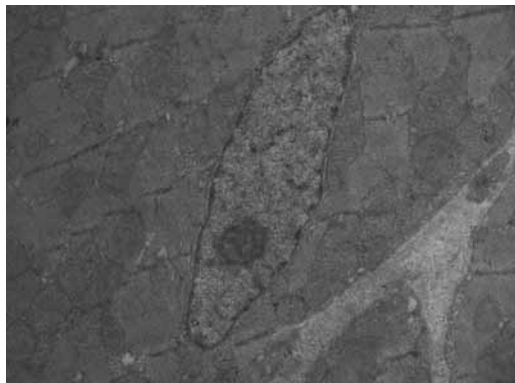


Рис. 5. Электроннооптический снимок миокарда левого желудочка крысы группы Н. Ультраструктура ядра и ядрышка вентрикулярного кардиомиоцита. Продолжительность эксперимента – 9 недель. Ув. 8.200 х.

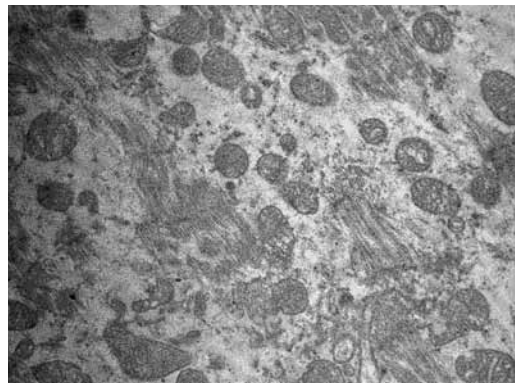


Рис. 6. Ультраструктурные проявления внутриклеточной репаративной регенерации в цитоплазме предсердного кардиального миоцита крысы группы Н. 9 неделя эксперимента. Электронная микрофотография. Ув. 9.900 х.

стве проявлений отсроченных апоптозов КМЦ при сохраняющихся признаках выраженной дезорганизации органелл цитоплазмы, её вакуолизации и внутриклеточного миоцитолитического. Следует отметить крайне низкий уровень субстратов энергообмена и возникновение локусов внутриклеточной регенерации (рис. 6).

В пользу предполагаемого антиапоптотического эффекта небиволола свидетельствовали отсутствие признаков апоптотически погибающих КМЦ как в левожелудочковом, так и в правопредсердном миокарде. Также следует обратить пристальное внимание на присутствие среди деструктивно измененных внутриклеточных структур аутофагосом и лизосом (аутофагия?), обнаружение небольших зон миоцитолитического.

В сердечномышечной ткани крыс группы Н также зачастую обнаруживались КМЦ с близкой к норме структурой миофибрилл, расположенных в окружении дилатированных цистерн саркоплазматического ретикулума и подвергшихся заметным повреждениям

митохондрий переменной формы и размеров, с прозрачным матриксом (нередко занимающим практически весь объем органеллы) и мизерным количеством крист. В матриксе некоторых, обычно локализованных вблизи ядра митохондрий можно было идентифицировать крупные округлые электронноплотные тельца.

К бесспорным морфологическим эффектам Н на фоне экспериментальной регенераторно-пластической СН можно отнести существенно менее выраженные проявления отека интерстиция и внутриклеточного отека КМЦ без каких-либо видимых нарушений целостности сарколеммы и межмиоцитарных вставочных дисков. Обнаруживающиеся в миокарде крыс группы Н проявления кардиосклероза коррелировали со спецификой структурно-функционального статуса тканевых элементов эндомизия, которые были обусловлены, в первую очередь, гетероморфностью выстилающего сосуда микроциркуляторного русла эндотелия, участием последнего в трансэндотелиальном транспорте, про-

явлениями как апоптоза эндотелиальных клеток, так и их новообразования, возможностью структурной реорганизации эндотелиоцитов, перицитов, лейкоцитов.

Констатируя относительную целостность ультраструктурной организации вставочных дисков и расположенных по их ходу межклеточных контактов, сарколеммы, порой мы обнаруживали локальные дилататы межклеточного пространства, заполненные рыхлым хлопьевидным материалом. Иногда подобными характеристиками обладали субсарколеммальные и межмиофибриллярные пространства. Судя по всему, в этом случае следует вести речь о проявлениях межклеточного и внутриклеточного отеков, которые, тем не менее, не носят однозначно альтерирующего характера, присущего, в частности, группе АДР в изученные сроки эксперимента.

Выводы

Пролонгированное курсовое введение адриамицина – антибиотика из ряда производных антрациклинов индуцирует у крыс выраженную кардиотоксическую реакцию с развитием к 9 неделе эксперимента характерной картины кардиомиопатии и регенераторно-пластической сердечной недостаточности. На данной модели сердечной недостаточности кардиоселективный β_1 -адреноблокатор с NO-модулирующим эффектом небиволол проявляет отчетливую кардиопротекторную активность. В пользу этого свидетельствуют существенное уменьшение выраженности процессов клеточной гибели (главным образом, апоптоза) кардиомиоцитов, демонстрируемая в большинстве сердечномышечных клеток отсроченная активация процессов вну-

триклеточной регенерации, структурная стабилизация компонентов гистогематического барьера и снижение проявлений внутриклеточного и, особенно, интерстициального отека.

Список литературы

1. *Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Семенов Д.Е.* Регенераторно-пластическая недостаточность сердца. Морфологические основы и молекулярные механизмы. – М.: Изд-во РАМН. 2003. 256 с.
2. *Семенов Д.Е., Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М.* Особенности антрациклиновой модели кардиомиопатии: снижение синтеза белка, нарушение внутриклеточной регенерации и безнекротическая элиминация кардиомиоцитов // Бюлл. эксп. биол. 2001. Т. 131. № 5. С. 594-600.
3. *Arola O.J., Saraste A., Pulkki K., Kalajoki M., Parvinen M., Voipio-Pulkki L.M.* Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis // Cancer Res. 2000. V. 60. P. 1789-1792.
4. *Diwakar J.* Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives // J. Nucl. Cardiol. 2000. Vol. 7. № 1. P. 53-62.
5. *Kalay N., Basar E., Ozdogru I.* Protective effects of carvedilol against anthracycline-induced cardiomyopathy // J. Am. Coll. Cardiol. 2006. Vol. 48. P. 2258-2262.
6. *Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo, G., Gianni L.* Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity // Pharmacol. Rev. 2004. Vol. 56. № 2. P. 185-229.
7. *Noori A., Lindenfeld J., Wolgel E., Ferguson D., Bristow M.R., Lowes B.* β -Blockade in adriamycin-induced car-

- diomyopathy // J. Card. Fail. 2000. Vol. 6. № 2. P. 115-119.
8. *Peng X., Chen B., Lim C.C., Sawyer D.B.* The cardiotoxicology of anthracycline chemotherapeutics: Translating molecular mechanism into preventative medicine // Mol. Interventions. 2005. V. 5. P. 163-171.
9. *Reynolds, E.S.* The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. V. 17. № 1. P. 208-212.
10. *Shan K., Lincoff A.M. & Young J.B.* Anthracycline-induced cardiotoxicity // Ann. Int. Med. 1996. Vol. 125. № 1. P. 47-58.
11. *Singal P.K., Iliskovic N.* Doxorubicin-induced cardiomyopathy // N. Engl. J. Med. 1998. Vol. 339. P. 900-905.
12. *Siveski-Iliskovic N., Kaul N. & Singal P.K.* Probuocol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats // Circulation. 1994. Vol. 89. P. 2829-2835.
13. *Watson M.L.* Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals // J. Biophys. & Biochem. Cytol. 1958. Vol. 4. P. 475-478.
14. *Watson M.L.* Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals: II. Application of solutions containing lead and barium // J. Biophys. & Biochem. Cytol. 1958. Vol. 4. P. 727-730.

Analysis of nebivolol cardioprotective effect on myocardium ultrastructure during regenerative & plastic heart failure in rats

Yu.N. Krotova, D.P. Khloponin, P.A. Khloponin, T.V. Archipova

Long-term course of treatment with an anthracycline antibiotic adriamycin induces a pronounced cardiotoxic reaction with a development of specific manifestations of regenerative & plastic heart failure in rats. Cardioselective β_1 -blocker nebivolol reveals evident cardioprotective activity in this heart failure model. It's confirmed by a considerable reduction of cardiomyocytes cell death processes intensity (mainly apoptosis), delayed activation of intracellular regeneration signs in the majority of heart muscle cells, structural stabilization of myohematic barrier components, and reduction of intracellular and especially interstitial edema manifestations.

Key words: nebivolol, beta-blocker, cardioprotection, adriamycin, heart failure, apoptosis.

Анализ ЭЭГ крыс при введении флуоксетина и его комбинации с мелатонином

О.М. Куделина, Ю.С. Макляков, Д.П. Хлопонин, А.Е. Матухно, Е.В. Ганцгорн

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Контактная информация: Куделина Оксана Михайловна oksana_kudelina@mail.ru

Депрессия в настоящее время является одной из наиболее распространенных форм психопатологии. Важным методом оценки эффективности медикаментозного лечения этого заболевания является электроэнцефалография. В экспериментах на крысах был выяснен характер распределения ЭЭГ-ритмов при сформированном депрессивном расстройстве, в том числе на фоне применения антидепрессанта флуоксетина – селективного ингибитора обратного захвата серотонина, как самостоятельно, так и в комбинации с препаратом гормона мелатонина – мелаксеном.

Ключевые слова: депрессия, крысы, ЭЭГ, флуоксетин, мелаксен.

По данным ВОЗ, депрессии в настоящее время представляют собой одну из наиболее распространенных форм психопатологии [2]. К 2020 г. депрессивные состояния могут стать второй по частоте причиной нетрудоспособности в мире [4]. В России проблема заболеваемости и смертности, обусловленных депрессивными расстройствами, приобрела особую значимость из-за колоссальных социальных потрясений последних десятилетий [7]. По некоторым данным, жалобы на подавленное настроение предъявляются пациентами их участковым врачам чаще, чем все прочие, вместе взятые [3]. Помимо этого, лишь порядка 50% больных депрессиями отвечают объективным улучшением своего состояния и снижением жалоб на применение современных медикаментозных и не медикаментозных методов лечения [5].

На сегодняшний день наиболее широко применяемыми на этапе первичного звена оказания медицинской помощи антидепрессантами в мире [6] являются селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), и, в частности,

флуоксетин. Это объясняется их оптимальным соотношением эффективности (безопасности) стоимости по сравнению с антидепрессантами других групп.

В связи с тем, что один из доминирующих симптомов депрессии – нарушение сна, ныне совместно с антидепрессантами рекомендуется использовать препараты гормона эпифиза – мелатонин. Последний представляет собой эндогенный антидепрессивный агент, не только способный модулировать специфические эффекты традиционных психотропных средств, но и вполне пригодный для самостоятельного терапевтического применения [1]. Единственным зарегистрированным в нашей стране лекарственным препаратом мелатонина является «Мелаксен» («Юнифарм Инк», США).

Одним из наиболее информативных методов диагностики при патологии головного мозга является компьютерная электроэнцефалография (КЭЭГ). Внедрение ее в клиническую практику позволило выявить достоверные маркеры для дифференциальной диагностики и оценки тяжести психических рас-

стройств. Однако, необходимо отметить, что использование приемов статистической обработки полученной электрофизиологической информации обуславливает необходимость поиска новых эффективных методов количественной оценки электроэнцефалографии (ЭЭГ) и объективного нейрофизиологического анализа состояния и активности центральной нервной системы у человека.

Важнейшее место среди методов количественной оценки эффективности использования психотропных препаратов занимает фармако-ЭЭГ, включающая комплекс ЭЭГ-профилей, отражающих спектральные характеристики биоэлектрической активности головного мозга в условиях патологии и на фоне действия психотропных средств.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на 42 белых нелинейных крысах-самцах возраста 3,5-4 мес. и массой 150-200 г. Животные содержались в условиях вивария при естественном режиме освещения, температуре воздуха $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности 55-60%, в пластиковых клетках размером $55 \times 45 \times 15$ см, с подстилкой из древесных опилок, по 4-5 особей в клетке. Крысы потребляли гранулированный комбикорм (производства ООО «Лабораторснаб») и воду *ad libitum* в поилках объемом 200 мл. В эксперимент животных забирали после 7 дней карантина. Все эксперименты были выполнены в соответствии с рекомендациями по гуманному обращению с лабораторными животными, утвержденными этическим комитетом РостГМУ.

В начале эксперимента животные были рассажены в отдельные клетки и распределены на 3 группы. Контрольную группу (группа К) составили 12 животных (интактные). Крысы обеих опытных

групп (в количестве по 15 особей) в течение 21 дня подвергались воздействию стрессорных факторов, после чего им вживлялись электроды и начинался курс приема лекарственных препаратов (ЛП). Животные одной из групп получали флуоксетин (группа Ф) *per os* в дозе 0,3 мг/кг, а второй (группа Ф+М) – комбинацию флуоксетина (в дозе 0,3 мг/кг *per os*) с мелаксеном (в дозе 0,25 мг/кг *per os*).

Моделирование депрессивного состояния у животных занимало 3 недели и происходило в 4 этапа. В течение первых 5 суток эксперимента производили ограничение подвижности животного в пластиковом контейнере в течение 2-х ч. В период 6-11 сутки применяли два стрессора: ограничение подвижности и водную иммерсию – крыс помещали в пластиковые контейнеры (где они могли совершать ограниченный круг движений), которые затем вертикально помещали в пустую емкость, медленно заполняемую водой при температуре 21°C на 10 мин, так что тела крыс были погружены в воду до уровня середины грудины (наполовину). В период 12-17 сутки производили комбинирование 2-х стрессоров – ограничения подвижности и водной иммерсии + ограничение подвижности в пластиковых контейнерах в течение 2-х ч. В течение последних 4 суток эксперимента (18-21 сут) крыс подвергали ограничению подвижности и водной иммерсии.

Параллельно с целью определения развития ангедонии проводился тест предпочтения раствора сахара (уменьшение потребления раствора сахарозы, обычно предпочитаемого крысами, по отношению к воде), который применяется для верификации развития у крыс депрессивноподобного состояния.

После индукции стрессорных воздей-

ствий животным в область соматосенсорной коры и гиппокампа (симметрично с обеих сторон) согласно атласу стереотаксических координат головного мозга крысы вживлялись микроэлектроды [11]. Операции проводились под эфирным наркозом при помощи стереотаксической установки СЭЖ-4 (производства Института физиологии им. А.А. Богомольца, Украина) и микроманипуляторов для погружения микроэлектродов, референтный электрод располагался в лобной пазухе. Фиксация электродов производилась на голове животного с помощью стоматологической пластмассы холодной полимеризации «Протакрил». Энцефалограмма мозга у крыс регистрировалась на энцефалографе-анализаторе ЭЭГА-21/26 «Энцефалан 131-03» (Россия). 2-3-е суток спустя после операции адаптированным животным начинали вводить вышеперечисленные ЛП. Электроэнцефалограмма снималась трехкратно: до, через 1 и 7 сут после приема ЛП. В группе К энцефалограмма головного мозга снималась через 4-5 дней после вживления электродов.

Изучались показатели относительной спектральной мощности (%) для Δ (дельта) – (1-4 Гц), θ (тета) – (5-7 Гц), α (альфа) – (8-12 Гц) и β (бета) – (13-30 Гц) частот-

ных диапазонов ЭЭГ крыс. Для объективной оценки результатов использовали метод количественного анализа структуры ЭЭГ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием общепринятых методов параметрической (t-критерий Стьюдента) статистики при помощи пакета статистических программ Statistica 6.0 (Statsoft, USA).

Результаты и их обсуждение

На ЭЭГ у животных в условиях сформированного депрессивноподобного состояния было продемонстрировано распределение частотных диапазонов в сторону низкочастотной активности с преобладанием Δ -ритма во всех отведениях, θ -ритма – в корковых отделах, а также снижением α -диапазона в области коры головного мозга по сравнению с группой К (табл. 1, 2).

Через 1 сутки после введения флуоксетина, в том числе его комбинации с мелаксеном, на ЭЭГ у животных групп Ф и Ф+М наблюдалось незначительное снижение Δ - и θ -ритмов и возрастание β -ритма (табл. 3).

В группе Ф+М β -частотный диапазон в области коры существенно возрос гораздо более значительно, чем при введении одного флуоксетина (табл. 4).

Таблица 1
ЭЭГ ОЗМ распределение по диапазонам частот контрольной группы животных, %

Координаты электродов	Дельта	Тета	Альфа	Бета
P4-A2	14,08±0,95	45,14±0,35	7,16±0,67	33,62±0,32
P3-A1	11,93±0,26	44,25±0,07	8,60±0,92	35,22±0,76
C4-A2	4,38±0,16	14,38±0,95	25,06±0,72	56,18±0,19
C3-A1	5,38±0,02	13,23±0,20	26,88±0,22	54,51±0,71

Примечание: P4-A2 – координаты электродов в гиппокампе справа;
P3-A1 – координаты электродов в гиппокампе слева;
C4-A2 – координаты электродов в соматосенсорной коре справа;
C3-A1 – координаты электродов в соматосенсорной коре слева; $p < 0,05$

Таблица 2

ЭЭГ ОЗМ распределение по диапазонам частот на фоне депрессии, %

Координаты электродов	Дельта	Тета	Альфа	Бета
P4-A2	33,58±0,73	51,93±0,09	6,17±0,11	7,32±0,31
P3-A1	36,26±0,86	49,58±0,27	5,88±1,68	8,28±0,50
C4-A2	33,22±0,46	49,99±0,17	7,27±0,59	9,28±0,17
C3-A1	32,50±0,85	52,21±0,84	7,83±0,48	8,46±0,88

Примечание: P4-A2 – координаты электродов в гиппокампе справа;
 P3-A1 – координаты электродов в гиппокампе слева;
 C4-A2 – координаты электродов в соматосенсорной коре справа;
 C3-A1 – координаты электродов в соматосенсорной коре слева; $p < 0,05$

Таблица 3

ЭЭГ ОЗМ распределение по диапазонам частот через 1 сутки после введения Флуоксетина, %

Координаты электродов	Дельта	Тета	Альфа	Бета
P4-A2	23,01±0,35	49,50±0,24	6,23±0,32	21,26±0,12
P3-A1	24,16±0,67	48,13±0,14	5,02±0,36	22,69±0,97
C4-A2	23,29±0,49	41,92±0,56	8,96±0,72	25,83±0,60
C3-A1	21,16±0,32	43,63±0,23	8,73±0,87	26,48±0,28

Примечание: P4-A2 – координаты электродов в гиппокампе справа;
 P3-A1 – координаты электродов в гиппокампе слева;
 C4-A2 – координаты электродов в соматосенсорной коре справа;
 C3-A1 – координаты электродов в соматосенсорной коре слева; $p < 0,05$

Таблица 4

ЭЭГ ОЗМ распределение по диапазонам частот через 1 сутки после введения Флуоксетина и Мелаксена, %

Координаты электродов	Дельта	Тета	Альфа	Бета
P4-A2	19,68±0,11	45,88±0,37	6,06±0,26	28,38±0,09
P3-A1	21,26±0,24	43,29±0,39	5,89±0,53	29,56±0,52
C4-A2	18,21±0,45	36,92±0,09	12,10±0,72	32,77±0,15
C3-A1	16,71±0,67	34,85±0,31	14,01±0,01	34,43±0,22

Примечание: P4-A2 – координаты электродов в гиппокампе справа;
 P3-A1 – координаты электродов в гиппокампе слева;
 C4-A2 – координаты электродов в соматосенсорной коре справа;
 C3-A1 – координаты электродов в соматосенсорной коре слева; $p < 0,05$

Таблица 5

ЭЭГ ОЗМ распределение по диапазонам частот через 7 дней после введения Флуоксетина, %

Координаты электродов	Дельта	Тета	Альфа	Бета
P4-A2	19,03±0,45	45,38±0,28	8,03±0,33	27,56±0,05
P3-A1	21,29±0,53	44,79±0,48	7,01±0,81	26,92±0,82
C4-A2	12,52±0,45	28,84±0,75	18,30±0,69	40,34±0,39
C3-A1	11,03±0,71	25,31±0,12	19,53±0,20	44,13±0,30

Примечание: P4-A2 – координаты электродов в гиппокампе справа;
 P3-A1 – координаты электродов в гиппокампе слева;
 C4-A2 – координаты электродов в соматосенсорной коре справа;
 C3-A1 – координаты электродов в соматосенсорной коре слева; $p < 0,05$.

Таблица 6

ЭЭГ ОЗМ распределение по диапазонам частот через 7 дней после введения Флуоксетина и Мелаксена, %

Координаты электродов	Дельта	Тета	Альфа	Бета
P4-A2	14,82±0,12	46,15±0,77	7,88±0,45	31,15±0,41
P3-A1	16,40±0,26	45,18±0,93	6,14±0,79	32,28±0,22
C4-A2	8,24±0,83	20,01±0,16	23,30±0,28	47,62±0,14
C3-A1	7,90±0,56	17,84±0,97	25,93±0,16	48,33±0,25

Примечание: P4-A2 – координаты электродов в гиппокампе справа;
 P3-A1 – координаты электродов в гиппокампе слева;
 C4-A2 – координаты электродов в соматосенсорной коре справа;
 C3-A1 – координаты электродов в соматосенсорной коре слева; $p < 0,05$.

Спустя 7 сут после применения исследуемых ЛП перераспределение ЭЭГ-ритмов было следующим: в группе Ф уверенно возрастал β - ритм, низкочастотные ритмы продолжали снижаться (особенно это касалось Δ -ритма во всех отведениях) (табл. 5); в группе Ф+М отмечалось преобладание α -ритма и β -ритма в корковых отделах мозга, в то время как Δ -ритм достоверно снижался везде, а θ -ритм – только в области соматосенсорной коры (табл. 6). Следует также отметить зафиксированные нами изменения поведенческих реакций у животных (в частности, повышение уровня двигательной активности) и увеличение потребления раствора сахарозы по отношению к воде.

В результате проведенного эксперимента по изучению биоэлектрической

активности головного мозга крыс при формировании депрессивного расстройства, а также с последующим введением флуоксетина и его комбинации с мелаксеном было установлено, что на энцефалограмме животных при сформированном депрессивном состоянии по сравнению с группой контроля преобладают низкочастотные диапазоны (Δ и θ). Применение флуоксетина сопровождается модуляцией этих показателей следующим образом: Δ -и θ -ритмы снижаются, а α - и β - – возрастают. Особенно это касается применения флуоксетина в комбинации с мелаксеном, причем уже через 1 сутки. На фоне приема этих препаратов в течение недели картина ЭЭГ продолжает меняться и все более приближается к показателям контроля.

Выводы

Таким образом, полученные в ходе проведенного эксперимента результаты свидетельствуют о том, что применение флуоксетина, особенно в сочетании с препаратом мелатонина мелаксеном, приводит к положительной динамике электроэнцефалографических показателей деятельности коры головного мозга и гиппокампа на модели депрессии у крыс. Это дает основание рекомендовать применение комбинации вышеуказанных лекарственных средств с целью фармакотерапии депрессивных расстройств.

Список литературы

1. **Арушанян Э.Б.** Изучение психотропной активности гормона эпифиза мелатонина- оригинальное направление наших исследований // Эксп. и клин. фарм. 2007. №.6 . С. 55-60.
2. **Пулягина Г. Я.** Депрессивные нарушения // Журнал практического врача. 2003. № 1. С. 40-49.
3. **Averina M., Nilssen O., Brenn T., Brox J.** Social and lifestyle determinants of depression, anxiety, sleeping disorders

and self-evaluated quality of life in Russia – a population-based study in Arkhangelsk // Soc. Psych Psychiatr. Epidemiol. 2005. Vol. 40. P. 511-518.

4. **Katz R.J.** Animal model of depression: Pharmacological sensitivity of hedonic deficit // Pharmacol. Biochem. Behav. 1982. Vol.16. P. 965-968.
5. **Kessler R.C., Chiu W.T., Demler O., Merikangas K.R., Walters E.E.** Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication // Arch. Gen. Psych. 2005. Vol. 62. P. 617-627.
6. **Kroenke S., West SL, Svindle R, et al.** Similar effectiveness of paroxetine, fluoxetine, and sertraline in primary care: a randomized trial // JAMA. 2001. Vol. 28. P. 47-55.
7. **Notzon F.C., Komarov Y.M., Ermakov S.P., Sempos C.T., Marks J.S., Sempos E.V.** Causes of declining life expectancy in Russia. // J. Am. Med. Assoc. 1998. Vol. 279. P. 793-800.
8. **Paxinos G., Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates., 4-th Edition. 1998. P. 403-405.

EEG-analysis of the rats during fluoxetine & fluoxetine with melatonin combination

О.М. Kudelina, Yu.S. Maklyakov, D.P. Khloponin, A.E. Matukhno, E.V. Ganzgorn

Today depression is one of the most common forms of psychopathology. Important evaluation criterion of the medicament treatment effectiveness of this illness is electroencephalogram. In the experiments on rats EEG rhythms distribution character during formed depressive disorder was analyzed after the usage of antidepressant fluoxetine, a selective inhibitor of serotonin uptake, including its combination with medicinal preparation of melatonin hormone melaxen.

Key words: depression, rats, EEG, fluoxetin, melaxen.

Изучение влияния нового синтетического пептида – производного аполипопротеина E COG1410 на поведение и морфологию головного мозга крыс CD после перенесенного фокального инсульта

Е.А. Туховская, А.В. Лобанов, А.Н. Мурашев

Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ФИБХ)

Контактная информация: Туховская Елена Александровна lenoktuk@rambler.ru

На модели фокальной ишемии головного мозга у самцов крыс CD изучали нейропротекторные свойства синтетического пептида COG1410, воспроизводящего последовательность рецептор-связывающего домена ApoE. Ишемию головного мозга моделировали путем окклюзии средней мозговой артерии с последующей реперфузией. Пептид вводили внутривенно через 30 минут после реперфузии. В течение 35 суток тестировали координацию и баланс, а также локомоторную асимметрию. В серийных срезах головного мозга вычисляли объем инфаркта. У животных, получивших COG1410, было показано улучшение моторных функций и уменьшение объема инфаркта правого полушария.

Ключевые слова: аполипопротеин E, инсульт, окклюзия, крысы, нейропротекция.

Аполипопротеин E (ApoE) является преимущественным апобелком цереброспинальной жидкости [6, 9, 11], он активно экспрессируется в период повреждения нервной ткани глиальными и нейрональными клетками [2, 4, 12, 13]. Эксперименты с животными, дефицитными [6, 10] или трансгенными [5] по гену ApoE, показали участие этого апобелка в процессах нейропротекции, нейрональной пластичности и реабилитации при патологии ЦНС. Однако интактный апобелок не проникает через гематоэнцефалический барьер [8], что и является основной проблемой использования его в качестве терапевтического агента. В этой связи был синтезирован пептид, повторяющий аминокислотную последовательность, локализованную в рецепторсвязывающем регионе ApoE 138-149 с остатками аминокислотной кислоты в позициях 140 и 145, который был назван COG1410 [7]. COG1410 оказывает выраженное противовоспалительное действие в опытах на цельной человеческой крови, стимулированной *ex vitro* липополисахаридом,

подавляя высвобождение медиаторов воспаления, включая фактор некроза опухоли альфа [7]. Представляло интерес исследовать нейропротекторные свойства COG1410 на модели фокальной ишемии головного мозга у грызунов. Использовали самцов крыс CD. Ишемию головного мозга моделировали путем окклюзии средней мозговой артерии внутрисосудистым филаментом в течение 90 мин с последующей реперфузией [3]. Во время окклюзии локальный мозговой кровоток, измеренный с помощью лазерного доплеровского флоуметра (Periflux 5001, PF5010 Laser Doppler Perfusion Module), уменьшался на 72-82%. Животных делили на три группы: животные, подвергшиеся окклюзии с последующим введением растворителя (окклюзия, n=10); животные, подвергшиеся окклюзии с последующим введением COG1410 (COG1410, n=9); ложнопериоперированные животные, которые не подвергались окклюзии (контроль, n=13). Через 30 мин после реперфузии животным болюсно вводили в хвостовую вену пептид COG1410 в дозе

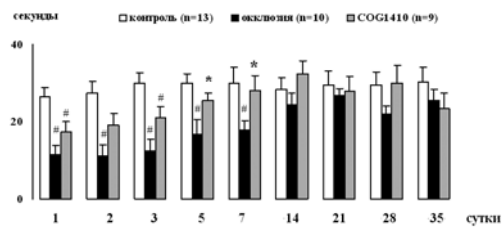


Рис. 1. Латентное время падения с вращающегося стержня
* - P < 0,05 по Mann Whitney относительно группы «окклюзия»
- P < 0,05 по Mann Whitney относительно группы «контроль»

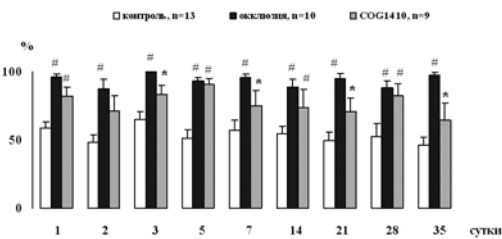


Рис. 2. Процент вращений в сторону повреждения после введения кетамина
* - P < 0,05 по Mann Whitney относительно группы «окклюзия»
- P < 0,05 по Mann Whitney относительно группы «контроль»

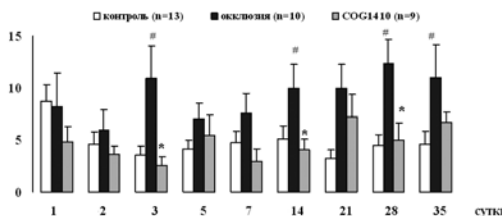


Рис. 3. Количество спонтанных вращений в сторону повреждения на открытой площадке
* - P < 0,05 по Mann Whitney относительно группы «окклюзия»
- P < 0,05 по Mann Whitney относительно группы «контроль»

0,8 мг/кг или растворитель (NaCl 0,9%) в объеме 1 мл/кг. В течение 35 суток после окклюзии или ложной операции животных тестировали с использованием батареи поведенческих тестов: «вращающийся стержень», кетамининдуцированная [1] и спонтанная вращательная асимметрия. На 36 сутки животных подвергали

ли эвтаназии ингаляцией CO₂. Головной мозг перфузировали через левый желудочек сердца раствором 3% формалина, подвергали криопротекции в 30% растворе сахарозы и готовили серийные срезы толщиной 50 мкм с интервалом 1000 мкм на криостате. Срезы окрашивали крезиловым фиолетовым и подвергали микроскопии и 3D-реконструкции с последующим вычислением объема инфаркта нервной ткани (программа Reconstruct Version 1.0.6.0).

Тестирование моторной координации в тесте «вращающийся стержень» выявило стойкие нарушения в группе «окклюзия» по сравнению с контрольной группой. Животные, получавшие COG1410, показали восстановление моторной координации до уровня контрольных животных быстрее, чем животные группы «окклюзия», что говорит об ускорении процессов компенсации неврологического дефицита пептидом COG1410 (рис. 1).

Результаты теста кетамининдуцированного вращения представлены как процент вращений вправо (в сторону повреждения) от тотального количества вращений в обе стороны (рис. 2).

Животные группы «окклюзия» демонстрировали стойкую асимметрию вращений на протяжении всего периода тестирования (35 суток), вращаясь преимущественно в сторону поврежденного полушария. Вращательная асимметрия у животных группы «COG1410» была значительно меньше выражена. Полученные результаты говорят о большей сохранности нервной ткани у животных группы «COG1410» по сравнению с животными группы «окклюзия».

COG1410 устранял спонтанную асимметрию, вызванную окклюзией, в то время как животные группы «окклюзия» проявляли вращательную асимметрию на протяжении всего периода тестирования (рис. 3).

При оценке объемов инфаркта в группе «контроль» не наблюдалось никаких повреждений. COG1410 статистически значимо уменьшил объем инфаркта правого полушария до 23±4%

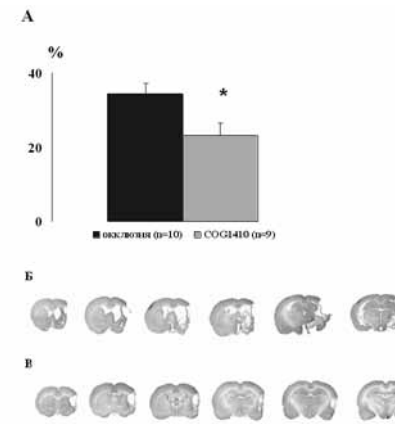


Рис. 4. Морфологическая оценка повреждения головного мозга
А. Объемы правого полушария
Б. Показательные серийные срезы для животных из группы «окклюзия»
В. Показательные серийные срезы для животных из группы «COG1410»
* - P < 0,05 по Mann Whitney относительно группы «окклюзия»

по сравнению с группой «окклюзия», объем инфаркта в которой составил 34±3% (рис. 4).

Таким образом, впервые показана эффективность пептида COG1410 на модели экспериментального инсульта у крыс CD. Этот пептид может быть рекомендован как новый перспективный нейропротектор при терапии ишемических повреждений головного мозга.

Investigation of the effects of new synthetic peptide – derivative of ApoE COG1410 on the behavior and brain morphology of CD rats subjected to focal stroke

Е.А. Tukhovskaya, A.V. Lobanov, A.N. Murashev

Using model of focal brain ischemia in males of CD rats, neuroprotective properties of peptide COG1410, with sequence of ApoE receptor-binding domain were investigated. Brain ischemia was performed by intraluminal occlusion of middle cerebral artery with further reperfusion. Peptide was injected intravenously 30 minutes after reperfusion. For 35 days the coordination and balance of animals, and also locomotor asymmetry were tested. In the serial slices of brain, the infarction volume was calculated. Animals, treated with COG1410, showed reliable improvement of motor functions and reduction of infarction volume of the affected hemisphere.

Key words: apolipoproteine E, stroke, occlusion, rats, neuroprotection.

Список литературы

1. *Лебедев С.В. с соавт.* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Том 135. №5. С. 500-504.
2. *Aoki K. et al.* // Stroke. 2003. V. 34 (4). P. 875-880.
3. *Belayev L. et al.* // Stroke. 1996. V. 27. P. 1616-1622.
4. *Boschert U. et al.* // Neurobiol. Dis. 1999. V. 6 (6). P. 508-514.
5. *Buttini M. et al.* // J. Neurosci. 1999. V. 19 (12). P. 4867-4880.
6. *Chen Y. et al.* // Neuroscience. 1997. V. 80. P. 1255-1262.
7. *Laskowitz D.T. et al.* // Acta. Neurol. Scand. 2006. V.114 (Suppl. 185). P. 15-20.
8. *Linton M. et al.* // J. Clin. Invest. 1991. V. 81. P. 270-281.
9. *Lynch J.R. et al.* // Ann. Neurol. 2002. V. 51. P. 113-117.
10. *Masliah E. et al.* // Exp. Neurol. 1995. V. 136 (2). P. 107-122.
11. *Pitas R.E. et al.* // J. Biol. Chem. 1987. V. 262 (29). P. 14352-14360
12. *Poirier J. et al.* // Brain. Res. Mol. Brain. Res. 1991. V. 11 (2). P. 97-106.
13. *Xu Q. et al.* // J. Neurosci. 2006. V. 26 (19). P. 4985-4994.

Фармакологические подходы к повышению устойчивости миокарда на модели острого инфаркта у крыс CD

Э.Р. Шайхутдинова^{1,2}, И.А. Боброва³, О.Н. Хохлова², Г.А. Слащева²,
А.Н. Мурашев²

¹ – Пушчинский Государственный Университет, Пушкино

² – Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ФИБХ РАН), Пушкино

³ – Eribis Pharmaceuticals AB, Uppsala, Sweden

Контактная информация: д.б.н. Аркадий Николаевич Мурашев murashev@fibkh.serpukhov.su

Изучены кардиопротективные свойства новых аналогов энкефалинов и показана их способность повышать устойчивость миокарда перед ишемическим и реперфузионным повреждением.

Ключевые слова: ишемическое прекондиционирование, морфин, энкефалины, крысы CD.

Кратковременные периоды ишемии и реперфузии способны защищать миокард от необратимых повреждений, вызванных последующим длительным ишемическим и реперфузионным стрессом. Это явление, обнаруженное в 1986 г. С.Е. Mungu с соавт. и названное ишемическим прекондиционированием (ИПК), ограничивает размеры инфаркта, улучшает восстановление функции сердца после ишемии [4]. В последующие годы было выяснено, что инициирование адаптационных механизмов ИПК возможно с помощью правильно подобранных фармакологических подходов, имитирующих защитные эффекты прекондиционирования миокарда без использования ишемических стимулов. Данное направление находится в стадии интенсивной разработки и может включать использование некоторых фармакологических препаратов, имитирующих эффекты прекондиционирования. Так, морфин может мимикрировать защитный эффект ИПК [6]. В 1996 г. было показано,

что фармакологическое прекондиционирование (ФПК) морфином повышает устойчивость сердца к повреждающему действию длительного нарушения коронарного кровотока [2, 3]. Также было показано, что экзогенное введение энкефалинов или их синтетических опиоидных аналогов уменьшали зону инфаркта при окклюзии коронарных сосудов у крыс. В поддержку этих данных было выдвинуто предположение, что увеличение концентрации энкефалинов в ткани желудочков крыс во время ишемии может быть компенсаторным механизмом, помогающим предотвратить развитие обширного инфаркта [5]. Весьма логично предположить, что заместительная терапия аналогами энкефалинов может оказаться эффективной при ишемии сердца.

В настоящей работе изучались кардиопротективные свойства новых синтетических аналогов энкефалина с кодовыми названиями EP91 и EP94, структура которых основана на общей тетрапептидной последовательности энкефалинов Туг–А–

Gly–Phe (защищена патентом) [1] на модели острого инфаркта миокарда у крыс CD в сравнении с ишемическим прекондиционированием и фармакологическим прекондиционированием морфином.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы животные SPF-статуса, полученные из Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, г. Пушкино. Животные содержались в стандартных условиях (температура $21 \pm 3^\circ\text{C}$, влажность 30–70%, 12-часовой период освещения, корм и вода – *ad libitum*). Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с требованиями Институтской Комиссии ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных.

На аутбредных самцах крыс *Sprague-Dawley* (300–350 г) под уретановым наркозом (1,5 г/кг, внутривенно) моделировали острый инфаркт миокарда окклюзией левой коронарной артерии с последующей реперфузией. Операцию проводили при искусственной вентиляции легких и поддержании температуры тела животного на уровне 37°C . В бедренную вену имплантировали катетер для введения веществ. Спустя 25 мин ишемии и 2 ч реперфузии определяли размер инфаркта стандартной методикой после окраски сердца метиленовым синим и 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом. На срезах сердца подсчитывали площадь зоны инфаркта (ЗИ) и зоны риска (ЗР) методом компьютерной планиметрии с помощью программы ImageTool.

Контролем служили животные, у которых моделировали окклюзию-реперфузию без дополнительных вмешательств. В группе «ИПК» за 30 мин до окклюзии крысы получали три 5-минут-

ные коронароокклюзии, разделенные между собой 5-минутными эпизодами реперфузии. В группе «ФПК» морфин гидрохлорид вводили 5-минутными инфузиями в дозе 20 мкг/кг/мин трехкратно с 5-минутными периодами покоя также до начала окклюзии [6]. Для оценки кардиопротективных свойств изучаемых синтетических аналогов энкефалинов животные получали три 5-минутные инфузии пептидов (в дозе 3,33 мкг/кг/мин в группе «EP91» и 0,66 мкг/кг/мин в группе «EP94») по схеме, аналогичной фармакологическому прекондиционированию. Дозы пептидов были выбраны согласно предварительным экспериментам.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 7 for Windows. Данные представляли в виде «среднее \pm стандартное отклонение», изменения исследуемых показателей считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В последние годы исследователи уделяют огромное влияние изучению механизмов адаптации к ишемии и поиску эндогенных медиаторов, обеспечивающих формирование толерантности сердца к ишемии. Такой интерес к проблеме связан с тем, что применение подобных медиаторов или их синтетических аналогов к клинической практике может существенно увеличить эффективность терапии острого инфаркта миокарда, а также позволит избежать многих осложнений, связанных с тотальной ишемией сердца. Изучение механизмов ишемического прекондиционирования показало, что ИПК развивается через триггеры и медиаторы, которые можно имитировать фармакологически агентами и таким путем стимулировать полезные эффекты ишемическо-

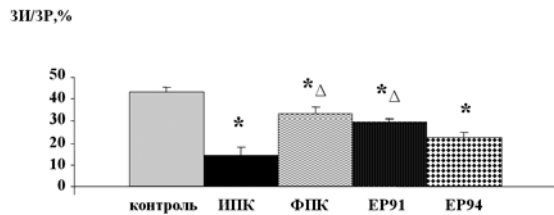


Рис. Размер зоны инфаркта (ЗИ), выраженный в процентах от зоны риска (ЗР) в контрольной и опытных группах.

* $P < 0,05$ относительно группы «контроль»;

Δ $P < 0,05$ относительно группы «ИПК»;

ANOVA с последующим тестом Манна-Уитни

го preconditionирования без эпизодов ишемии. С клинической точки зрения, preconditionирование фармакологическими средствами выглядит предпочтительнее ИПК, так как технологически проще и лишено потенциальной опасности ишемических эпизодов для измененного миокарда. Средства, имитирующие ИПК, показали себя перспективными в экспериментальных исследованиях.

Так, агонисты опиатных рецепторов обладают прямыми кардиопротективными свойствами, которые нельзя просто объяснить изменениями коронарного кровотока или кислородного баланса миокарда. Эти препараты непосредственно производят фармакологическое preconditionирование и косвенно усиливают защитные свойства ИПК, формируя защиту против ишемического повреждения миокарда. Ряд исследований указали, что активация опиатных рецепторов морфином сопровождается кардиопротекторным эффектом. Но морфин обладает рядом побочных эффектов, возникновение которых крайне нежелательно у пациентов с миокардиальной ишемией. Одним из перспективным направлением является создание новых опиоидных лигандов, обладающих высоким профилем активности и безопасности по сравнению с уже существующими опиоидными соединениями.

В данной работе были изучены кардиопротективные свойства новых аналогов энкефалинов компании Eribis Pharmaceuticals AB с кодовыми названиями EP91 и EP94 по сравнению с ишемическим preconditionированием и фармакологическим preconditionированием морфином.

В контрольной группе значение ЗИ/ЗР составило $42,9 \pm 2,7\%$ (рис.). Ишемическое preconditionирование приводило к значительному уменьшению зоны инфаркта в группе ($14,1 \pm 4,1\%$, $P < 0,05$ относительно контроля). В группе «фармакологическое preconditionирование» морфином размер инфаркта уменьшался менее значительно, но также статистически значимо ($33,3 \pm 2,7\%$). При предварительном введении синтетических аналогов EP91 и EP94 наблюдалось выраженное снижение зоны инфаркта до $27,5 \pm 2,4\%$ и $26,0 \pm 3,5\%$ соответственно, причем введение пептида EP94 было более эффективно.

Результаты нашей работы подтвердили, что опиоиды являются триггерами классического preconditionирования и эффективны при уменьшении размера инфаркта [2].

Выводы

Таким образом, энкефалиновые аналоги, имеющие кардиопротективный

эффект, потенциально могут быть использованы как средства, повышающие устойчивость миокарда при ишемических и реперфузионных повреждениях. Однако необходимо отметить, что кардиопротективное действие данных пептидов нуждается в более детальном изучении непосредственно во время ишемии и сразу после окклюзии, что может быть еще более полезным в клинической практике.

Список литературы

1. Bobrova I. Pat. 12310193 PCT/SE2007/000731. Cardioprotective compounds.
2. Gross G. Role of opioids in acute and delayed preconditioning // J. Mol. Cell. Cardiol. 2003.V. 5. P.709-718.
3. Jackson K.E., Farias M., Stanfill A.S. et al. Transient arterial occlusion raises enkephalin in the canine sinoatrial node

and improves vagal bradycardia // Auton. Neurosci. Basic Clin. 2001. V. 256. P. 84-92.

4. Murry C., Jennings R., Reimer K. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // Circulation. 1986. V.74. P.1124-1136.
5. Paradis P., Dumont M., Belichard P. et al. Increased preproenkephalin A gene expression in the rat heart after induction of myocardial infarction // Biochem. Cell Biol. 1992. V.70. P.593-598.
6. Schultz J., Hsu A., Gross G. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via glibenclamide-sensitive mechanism // Circ. Res. 1996. V.78. P.1100-1114.

Pharmacological approaches to increase of stability of a myocardium on model of a sharp heart attack at CD rats

E.R. Shayhutdinova, I.A. Bobrova, O.N. Hohlova, G.A. Slasheva, A.N. Murashev

Cardioprotective properties of new enkephalin analogs are studied and their ability to raise stability of a myocardium before ischemic and reperfusion damage is shown.

Key words: ischemic precondition, morphine, enkephalin, CD rats.



Подбор индивидуального праймера и оптимизация условий проведения полимеразной цепной реакции для обнаружения гена GFP (green fluorescent protein)

Н.В. Касинская, С.Е. Деньгина, О.И. Степанова, Ю.В. Фокин

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Касинская Наталья Владимировна M-Sklad@yandex.ru

Впервые получен праймер и адаптирована программа его работы для ПЦР-диагностики гена зеленого белка (GFP). Моделями исследования служили мышцы линии B10.GFP из коллекционного фонда НЦМБТ РАМН. Данный праймер позволит быстро и качественно с помощью ПЦР-метода определить наличие или отсутствие гена GFP в любом искомом образце ДНК, принадлежность к линии лабораторных животных, имеющих в геноме данный ген GFP. Он также удобен для работы в области трансплантологии (позволяет определить наличие или отсутствие донорских клеток в тканях реципиента).

Ключевые слова: ген GFP, праймер, мышцы B10.GFP, амплификация, температура отжига.

В настоящее время флуоресцентные белки являются незаменимым инструментом для изучения процессов, протекающих внутри живых клеток. GFP (green fluorescent protein – зеленый флуоресцентный белок, или белок зеленой флуоресценции) был обнаружен Shimomura с соавт. в 1962 г. у люминесцирующей медузы *Aequorea victoria*. Ген GFP был клонирован в 1992 г. Prasher и соавт., и уже через несколько лет началось активное использование этого гена как репортерного в работах с самыми разными про- и эукариотическими организмами. Сейчас ген GFP применяется в сотнях работ во всем мире, и число их стремительно возрастает. Столь быстрый рост вызван особыми свойствами белка GFP, а именно его способностью флуоресцировать в видимой (зеленой) области спектра при об-

лучении длинноволновым УФ. Эта флуоресценция обусловлена непосредственно белком, для ее проявления не требуется субстратов или кофакторов. Благодаря этому свойству ген GFP является очень перспективным геном, позволяющим проводить разнообразные прижизненные (недеструктивные) исследования с трансгенными организмами. А получение в 2008 г. Нобелевской премии по химии О. Симомуре, Р. Тсьеню и М. Чалфи за открытие и применение зелёного флуоресцентного белка показывает, насколько актуальны работы в данном направлении.

В результате клонирования гена зеленого флуоресцирующего белка и внедрения его в геном кишечной палочки (*Escherichia coli*) [3] был получен белок в количестве, нужном для его исследований, в том числе для расшифровки аминокислотной последо-

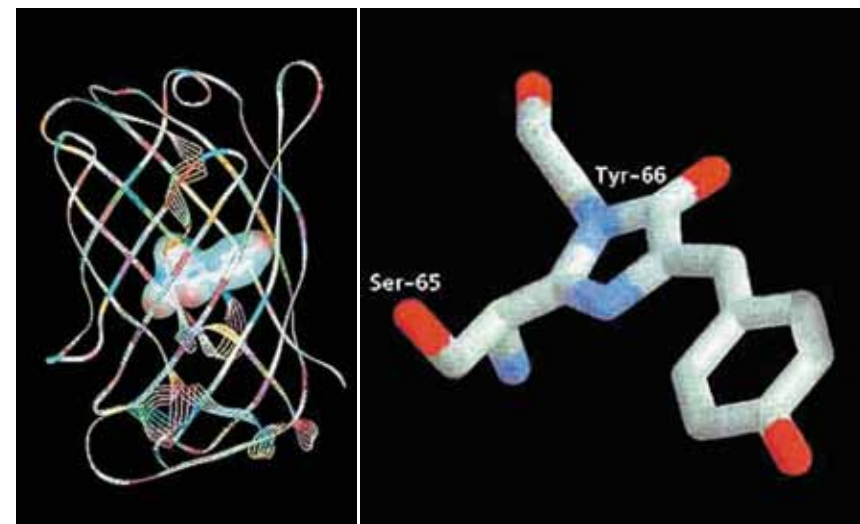


Рис. 1. Схема строения молекулы зеленого флуоресцирующего белка (справа) и ее хромофорной группы [1].

вательности, и выявлены совершенно уникальные особенности GFP. Оказалось, он, в отличие от всех до того известных окрашенных и флуоресцирующих белков (хромопротеидов: фикобиллинов, фикоэритринов, каротенопротеинов), для обретения оптических свойств не нуждается в какой-либо внешней хромофорной группе или в солях тяжелых металлов. Извне для его «созревания» – появления яркой зеленой флуоресценции – требуется только молекулярный кислород. Этот процесс длится довольно долго. Детектируемая флуоресценция появляется через 1,5 ч после синтеза, а достигает максимума только через несколько часов. При «созревании» в пептидной цепи белка образуется р-гидроксibenзильден-имидазолиновое кольцо из трех аминокислотных остатков, следующих друг за другом: серина-65, тирозина-66 и глицина-67 (рис. 1). Это кольцо и служит хромофорной группой. В ходе такой реакции Тир-66 автокаталитически дегидрируется и окисляется молекулярным кислородом. Не вошедшая в состав хромофора часть пептидной цепи белка скручивается в подобие бочки или клетки, внутри которой помеща-

ется хромофор. Стенки «бочки» образованы 11 β-складками, а крышка, дно и связки с хромофором – α-спиральными участками белковой молекулы [1].

На общей схеме видно, что молекула имеет форму бочки, внутри которой заключены аминокислоты серин-65, тирозин-66 и глицин-67, образующие хромофор.

Для обнаружения гена зеленого белка GFP в ДНК донорских клеток костного мозга и отслеживания поведения этих клеток после их трансплантации реципиентам применялся метод ПЦР, являющийся одним из основных методов современной молекулярной генетики. С его помощью можно специфически амплифицировать любой известный ген. Его использование дает возможность достичь больших успехов в области генетического картирования, изучения генетического полиморфизма, мутаций и генетических механизмов в молекулярной иммунологии, в молекулярной вирусологии, онкологии, судебной медицине, диагностике наследственных и инфекционных заболеваний, в трансплантологии.

Идентифицировать трансплантируемые клетки можно с помощью получения кри-

осрезов органов и тканей проведения фазо-контрастной и флуоресцентной микроскопии клеточного материала, но ПЦР, со своей высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет гарантированно быстро и надежно получить результат.

Целью настоящего исследования является подбор, синтез и адаптация работы праймеров для проведения полимеразной цепной реакции.

Для постановки ПЦР необходимо решить следующие задачи:

1. определить температуру отжига праймера;
2. определить концентрацию веществ в рабочей смеси.

Для этого необходимо:

- минимальное количество ДНК, имеющего в наличии ген GFP;
- образец ДНК, в которой нет этого гена;
- пара олигонуклеотидов (праймеров), ограничивающая искомым ген;

Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфичного фрагмента и ориентированы таким образом, что дотраивание новой цепи ДНК протекает только между ними.

- термостабильная ДНК-полимераза – фермент, участвующий в синтезе двухцепочечной ДНК;
- набор из четырех нуклеотидов для формирования новой цепочки ДНК дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- ионы Mg, необходимые для работы полимеразы;
- буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции – pH, ионную силу раствора.

Важнейшей характеристикой праймеров является температура плавления, при которой половина ДНК-матриц образует

комплекс с олигонуклеотидным праймером. Температуру плавления можно приблизительно определить по формуле:

$$T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_G + n_C),$$

где nX – количество нуклеотидов X в праймере.

Материалы и методы

Настоящий эксперимент проводился в НЦБМТ РАМН. Нами были использованы: экспериментальная группа – 150 мышей линии B10.GFP (полученные от скрещивания мышей линии C57BL/10SnY и мышей линии C57BL/6-TgN (ACTbEGFP) 10sb-Jackson Laboratory, предоставленные нам лабораторией Osb-Jackson – США) и контрольная группа – 40 голов мыши линии C57BL/6.

Нуклеотидная последовательность гена была определена с помощью первичных баз данных и программы обработки [2].

Эксперимент проводился в три этапа:

1. Выделение ДНК из пробы печени мышей при помощи набора Diatom DNA Prep 100 (ООО «Компания Биоком», Россия), по инструкции фирмы-производителя.
2. Амплификация геномной ДНК (в термоциклере «Терцик», компания «ДНК-Технология», Россия).
3. Идентификация ПЦР продуктов методом горизонтального электрофореза. Гели сканировали в ультрафиолетовом свете при помощи трансиллюминатора GellChem Doc («Bio-Rad» США). Наличие в геле полосы ДНК соответствующего размера свидетельствует о наличии в образце искомого гена.

1 этап: ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

- 1.1. Приготовление рабочего раствора солевого буфера. Содержимое

флакона с 10-кратным солевым буфером (10 мл) переносим в мерный цилиндр, доводим бидистиллированной водой до метки 100 мл и 96% этиловым спиртом до метки 300 мл, перемешиваем.

- 1.2. В пробирку объемом 1,5 мл вносим 100 мкл исследуемой пробы, добавляем 400 мкл лизирующего реагента, перемешиваем содержимое пробирки переворачиванием (5-10 раз).
- 1.3. Термостатируем пробирку со смесью 5-7 мин. при температуре 65°C.
- 1.4. Проводили центрифугирование пробирки со смесью 10 сек. при 5000 g. Прозрачный супернатант целиком перенесли в чистую пробирку.
- 1.5. В пробирку с чистой смесью добавили 20 мкл суспензии сорбента NucleoS.
- 1.6. Пробирку помещали на ротатор и перемешивали 10 мин. (10-20 об./мин)
- 1.7. Центрифугировали 10 с при 5000 g.
- 1.8. Удалили супернатант с помощью водоструйного насоса.
- 1.9. К осадку добавили 200 мкл лизирующего реагента, перемешали на вортексе до полного гомогенного состояния.
- 1.10. Добавили в пробирку 1 мл рабочего раствора солевого буфера.
- 1.11. Перемешали содержимое пробирки переворачиванием 5-10 раз.
- 1.12. Центрифугировали 10 с при 5000 g.
- 1.13. Удалили супернатант с помощью водоструйного насоса.
- 1.14. Добавили в пробирку 1 мл солевого буфера, перемешали содержимое пробирки на вортексе, центрифугировали 10 с при 5000 g и удалили супернатант с помощью насоса.
- 1.15. Просушили осадок при температуре 65°C в течение 4-5 мин.
- 1.16. В эту же пробирку внесли 50-100 мкл ЭкстраГена.

- 1.17. Суспендировали содержимое пробирки на вортексе 5-10 с до получения гомогенной суспензии, затем термостатировали 4-5 мин при 65°C.
- 1.18. Центрифугировали 1 мин при 10000 g.

2 этап: АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК

Амплификацию геномной ДНК проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология», Россия).

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала:

- 1,0 мкл геномной ДНК;
- 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы;
- 2,5 мкл 10x буфера;
- 2,5 мкл 25 mM хлорида магния;
- 0,5 мкл 10 mM dNTP;
- 0,5 мкл 10 M primers;

1-я пара -

5'-CACATGAAGCAGCACGACTTCT-3'

5'-AAC TCC AGC AGG ACC ATG TGAT-3'

2-я пара -

5'-CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC T-3'

5'-AAC TCC AGC AGG ACC ATG TGAT-3'

- 17,8 мкл воды.

Протокол амплификации включал:

- 1 цикл: 94°C – 3 мин;
- 38 циклов: 94°C – 15 с;
- 62°C – 30 с;
- 72°C – 30 с.

3 этап: ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЦР-ПРОДУКТОВ

Гель-электрофорез – стандартный метод разделения смеси молекул ДНК по размеру. Он основан на том, что молекулы ДНК в растворе заряжены отрицательно и под действием электрического поля движутся к аноду. Поры геля обладают эффектом сита, в результате малые молекулы движутся к аноду быстрее, чем большие. Разделяющая способность геля зависит от размера пор, который, в свою очередь, зависит от концентрации

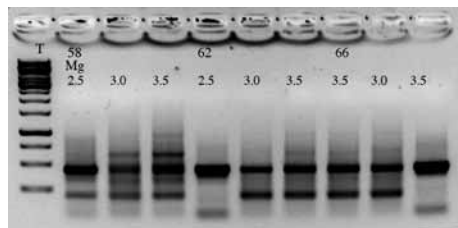


Рис. 2. Электрофоретический спектр продуктов амплификации с праймером B.10GFP, ДНК мыши линии B.10GFP.

- 1 – маркер молекулярной массы 100b;
- 2 – спектр продуктов амплификации при $t = 58^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 2,5$ мкл;
- 3 – спектр продуктов амплификации при $t = 58^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,0$ мкл;
- 4 – спектр продуктов амплификации при $t = 58^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,5$ мкл;
- 5 – спектр продуктов амплификации при $t = 62^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 2,5$ мкл;
- 6 – спектр продуктов амплификации при $t = 62^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,0$ мкл;
- 7 – спектр продуктов амплификации при $t = 62^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,5$ мкл;
- 8 – спектр продуктов амплификации при $t = 66^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 2,5$ мкл;
- 9 – спектр продуктов амплификации при $t = 66^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,0$ мкл;
- 10 – спектр продуктов амплификации при $t = 66^\circ\text{C}$, $\text{Mg} = 3,5$ мкл.

геля. Положение отдельных молекул ДНК при электрофорезе в агарозных гелях выявляют с помощью интеркалирующего красителя – бромистого этидия, который образует с фрагментами ДНК прочные соединения. Эти соединения под действием УФ-облучения способны флуоресцировать, что регистрируется в виде светящихся полос.

Протокол проведения электрофореза и детекции продуктов ПЦР.

Электрофорез проводили с помощью комплекта реагентов № 2 «ДНК-Технология» по инструкции к применению. Для приготовления рабочего раствора буфера для электрофореза содержимое пакета с надписью «Буфер для электрофореза» полностью переносили в мерную колбу, растворяли в 600-800 мл дистиллированной воды и доводили объем полученного раствора до 1 л дистиллированной водой. Приготовление агарозного геля. Содержимое одного из пакетов с надписью «Агароза» полностью переносили в коническую стеклянную колбу на 250-500 мл, прибавляли 150 мл рабо-

чего раствора буфера для электрофореза и перемешивали. Суспензию агарозы в колбе доводили до кипения в СВЧ-печи периодически помешивая. Расплав охлаждали до $55-60^\circ\text{C}$, затем прибавляли 10 мкл раствора бромистого этидия и перемешивали. Наливали расплав агарозы на столик для заливки геля. Столик с готовым агарозным гелем и гребенками переносили в камеру для электрофореза, куда был налит рабочий раствор буфера для электрофореза. Проведение электрофореза. Из-под слоя минерального масла отобрали 10 мкл ПЦР-смеси и перенесли в карман гелевой пластины. Туда же внесли 2-3 мкл краски-лидера. Подключили прибор к источнику напряжения, соблюдая полярность электродов, и учитывая, что движение фрагментов ДНК происходит в направлении от катода к аноду. Установили напряжение около 120 В. По окончании электрофореза источник напряжения отключили. Агарозный гель перенесли на УФ-фильтр трансиллюминатора GellChemi Doc («Bio-Rad» США) для детекции. Производили визуализа-

цию и регистрацию полученных результатов с помощью программы «Quantity One».

Результаты и их обсуждение

Подобраны оптимальные условия работы праймера гена GFP. Полимеразная цепная реакция проводилась при указанных выше величинах компонентов реакционной смеси, изменению подвергались температура отжига праймера, а также концентрация хлорида магния. Амплификацию проводили при температуре отжига праймера: 58°C , 62°C , 66°C . Концентрацию магния в первом варианте брали – 2,5 мкл, втором – 3,0 мкл, третьем – 3,5 мкл. Были получены электрофоретические спектры продуктов амплификации, проанализировав которые можно сказать, что оптимальная температура отжига – 62°C , и концентрация $\text{MgCl}_2 = 2,5$ мкл 25 мМ (рис. 2). При этих величинах специфическая полоса наиболее отчетлива и показательна (трек 5). Таким образом, мы получили праймер и программу амплификации, которые позволили определить наличие гена GFP в экспериментальной группе мышей B.10GFP для их генотипирования, т.е. их соответствие данной линии. Новый полученный праймер дает возможность подтверждать наличие или отсутствие искомого гена.

Данный праймер и программа амплификации могут быть использованы для разных научных целей в генетике и в трансплантологии как более точный метод для визуализации донорских клеток.

Выводы

Впервые подобран и адаптирован индивидуальный праймер на ген зеленого белка GFP.

Подобрана программа амплификации с этим праймером.

С помощью данного праймера можно проводить генотипирование линии мышей B.10.GFP.

Полученный праймер позволит осуществить качественный анализ при выявлении донорских клеток с геном зеленого белка в организме реципиента и может быть использован в трансплантологии.

Список литературы

1. *Лабас Ю.А., Гордеева А.В., Фрадков А.Ф.* Флуоресцирующие и цветные белки. М.: Природа. 2003. № 3 С. 33-43.
2. *Примроуз С., Тваймен. Р.* Геномика. Роль в медицине. Перевод с английского канд. хим.наук О.Н. Королевой. М.: Бином. Лаборатория знаний. 2008. С. 58-59.
3. *Prasher D.C., Eckenrode V.C., Ward W.W. et al.* // Gene. 1992. V. 111. P. 229-233.

Selection of individual primer and optimization of conditions of carrying out chain reaction for gene GFP (green fluorescent protein) detection

N.V. Kasinskaya, S.E. Dengina, O. I. Stepanova, Yu.V. Fokin

Primer for polymerase chain reaction (PCR) was received. This method allows genetic typing a gene of green protein at transgene mice of line B10.GFP and opens possibility for search of donor cells with a label of a gene of green protein at recipients after their transplantation, as more exact method.

Key words: gene GFP, primer, mice B10.GFP, amplification, annealing temperature.

Сравнительное изучение в эксперименте эффективности применения наноструктурированных, минеральных и природных компонентов при костных дефектах

Р. В. Мартиросян¹, А. Б. Шехтер², В. Н. Балин¹, Г. Д. Капанадзе³,
Л. В. Винокурова⁴

¹ – Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

² – Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

³ – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

⁴ – ГБУЗ ГП №153 Департамента здравоохранения Москвы

Контактная информация: д.б.н. Гия Джемалиевич Капанадзе giyak@yandex.ru

Было проведено гистологическое изучение полученных материалов в эксперименте на лабораторных животных (кролики) по сравнительной эффективности отдельного и комбинированного применения наноструктурированных β-трикальцийфосфатной керамики и гидроксиапатита (минеральный компонент), комплексного гомеопатического препарата траумель С (природный компонент) и богатой тромбоцитами плазмы из аутокрови.

Ключевые слова: эффективность комбинации остеоматериалов, препарата траумель С и богатой тромбоцитами плазмы, кролики.

В современной стоматологической практике важным вопросом является выбор наиболее эффективного остеоматериала, или его комбинация с другими факторами, для повышения эффективности и ускорения репаративного остеогенеза в процессе заживления костных ран.

Целью нашей работы явилось изучение в эксперименте на лабораторных животных сравнительной эффективности отдельного и комбинированного применения минеральных (наноструктурированного гидроксиапатита и β-трикальцийфосфатной керамики) остеоматериалов и гомеопатического комплексного препарата траумель С [1] в сочетании с богатой тромбоцитами плазмой из аутокрови животного, а также гистологическое изучение полученных костных дефектов альвеолярных

дуг челюстей кроликов в временной динамике. Траумель С — комплексный гомеопатический препарат, содержащий микроэлементы и обладающий широким спектром фармакологического действия: противовоспалительным, антиэкссудативным, иммуностимулирующим, регенерирующим, обезболивающим, антигеморрагическим, веноотонизирующим [2].

Материалы и методы

В эксперименте использовали 14 самцов кроликов породы советская шиншилла в возрасте 6 мес., с живой массой 4,5±0,2 кг. Животные соответствовали категории SPF. Кролики содержались в индивидуальных клетках батарейного типа на решетчатых полах в виварии НЦБМТ РАМН. Для кормления использовали стандартный комбикорм грану-

лированный полнорационный для кроликов. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

Из 14 животных было сформировано 6 групп. В группах I-IV по 2 кролика и в группах V-VI — по 3 кролика.

В качестве наркоза применяли ветеринарный препарат «Золетил 100», который вводили в дозе 15 мг/кг в ушную вену. Под общей анестезией делался наружный разрез длиной 2 см в средней части нижней челюсти с одной стороны, отслаивались мягкие ткани шаровидной фрезой при помощи хирургического физиодиспенсера. Формировали костный округлый несквозной дефект диаметром 0,5 см и глубиной 3-4 мм. Костные дефекты заполнялись различными остеопластическими материалами:

I группа. Контрольная (заполнение кровяным сгустком).

II группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированной β-трикальцийфосфатной керамики.

III группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированного гидроксиапатита.

IV группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированной β-трикальцийфосфатной керамики и гидроксиапатитом в соотношении 50/50 [3].

V группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированной β-трикальцийфосфатной керамики и гидроксиапатитом в соотношении 50/50, а также жидким раствором траумель С.

VI группа. Дефект на 2/3 заполнялся гранулами наноструктурированной β-трикальцийфосфатной керамики и гидроксиапатитом в соотношении 50/50, жидким раствором траумель С, сверху — богатой тромбоцитами плазмой [4]. Для её получения из ушной вены кролика стерильным одноразовым шприцом брали около 5 мл крови, которая потом в течение 15 мин. подвергалась двойному центрифугированию в аппарате SmartPrep2 (HARVEST USA) [5].

В каждой группе материал забирался через 1 и 2 мес. Костные фрагменты альвеолярных дуг с участком дефекта фиксировались в нейтральном формалине, подвергались декальцинации с помощью препарата Биодек. После парафиновой заливки срезы толщиной 4-5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, просматривались на микроскопе Олимпус BX51, фотографировались с помощью камеры Sony и программы Launch Cam View.

Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ), и в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986). Исследования выполнялись согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами (СОП) исследователя, санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических

клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [6]. Протокол эксперимента был разработан при участии и одобрении биоэтической комиссии НЦБМТ РАМН.

Обработка материалов

I группа. Контрольная (заполнение кровяным сгустком).

1 месяц после операции.

В материале видны часть зуба, окружающая костная ткань альвеолярного отростка и участок дефекта кости. Дефект заполнен в основном плотной грубоволокнистой фиброзной соединительной тканью (рис. 1). Ткань состоит из коллагеновых волокон, фибробластов веретеновидной формы, немногочисленных лимфоцитов и макрофагов, относительно богата сосудистыми элементами. В самой ткани новообразованных костных трабекул не отмечается. Однако на границе между вышеописанной тканью и костью альвеолярного отростка отмечаются новообразования незрелых

костных трабекул частично остеоидной структуры. Эти трабекулы отличаются от зрелых трабекул ткани большим количеством остеоцитов, располагающихся как внутри трабекул, так и на их поверхности. Кроме того, на поверхности трабекул видны единичные остеокласты.

2 месяца после операции.

Полость костного дефекта в значительной степени заполнена молодой костной тканью. Часть бывшего дефекта занята фиброзной грубоволокнистой соединительной тканью, однако большая часть заполнена костными трабекулами, которые отличаются большей зрелостью, чем в предыдущий срок. В них уменьшено содержание остеоцитов. Остеоидная ткань отсутствует, по краям видны уже относительно зрелые оформленные костные трабекулы (рис. 2).

II группа. β -трикальцийфосфатная керамика.

1 месяц после операции.

Костный дефект в основном заполнен новообразованными умеренно зрелыми костными балками. Грубоволокнистая соединительная ткань отсутствует,

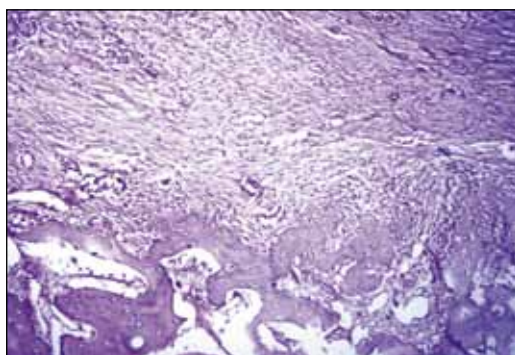


Рис. 1. Костный дефект в основном заполнен грубоволокнистой соединительной тканью (вверху), на границе с костью альвеолярного отростка видны остеоидные массы (справа) и новообразованные костные трабекулы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

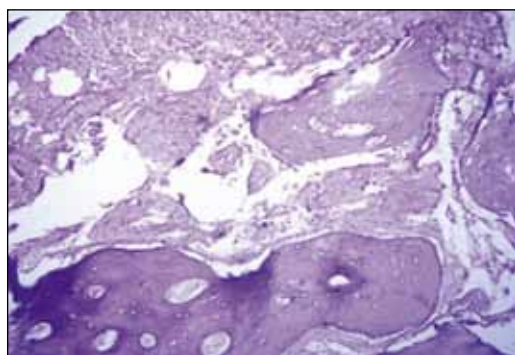


Рис. 2. В верхней части снимка волокнистая соединительная ткань, в средней части – созревающие костные трабекулы, в нижней части – зрелые трабекулы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

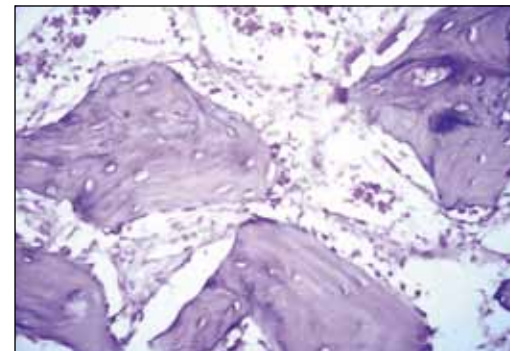


Рис. 3. В костном дефекте видны новообразованные костные балки. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 400.

между балками выявляется костный мозг (рис. 3).

2 месяца после операции.

Большая часть бывшего костного дефекта заполнена относительно зрелыми трабекулами, которые местами компактизируются (рис. 4).

III группа. Гидроксиапатит (ГАП).

1 месяц после операции.

Часть костного дефекта занята относительно зрелыми новообразованными костными балками, другая часть — плотной фиброзной грубоволокнистой

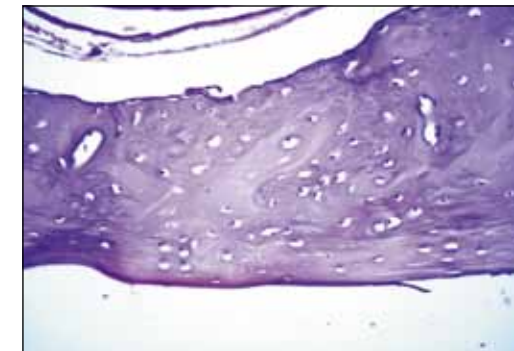


Рис. 4. Дефект заполнен относительно плотной костной тканью. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

тканью. В последней видны гранулы ГАП разных размеров. Гранулы окружены капсулой с высоким содержанием извести (базофилы при окраске ГЭ) (рис. 5). Кроме того, в просвете видна очень крупная гранула (по-видимому, из слившихся мелких гранул). На границе этой крупной гранулы, между ней и соединительной фиброзной тканью формируется костная ткань (рис. 6).

2 месяца после операции.

Костный дефект в основном заполнен относительно зрелой новообразованной

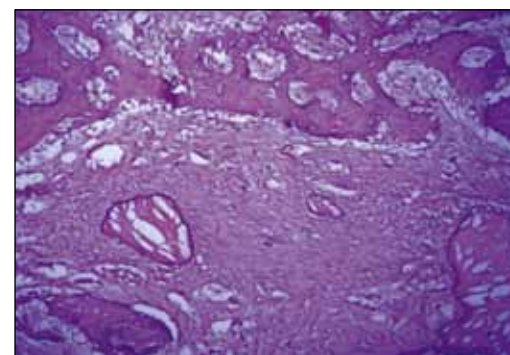


Рис. 5. Вверху – новообразованные костные балки с началом формирования костного мозга, внизу – грубоволокнистая соединительная ткань с гранулами ГАП. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

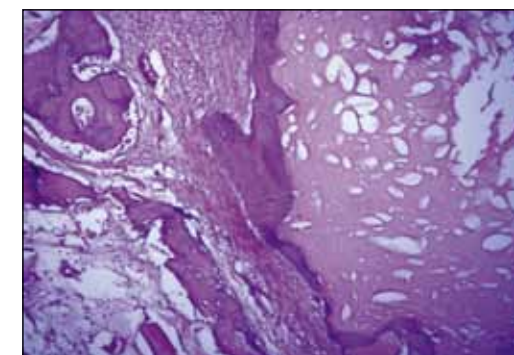


Рис. 6. Справа — часть крупной гранулы ГАП, в середине снимка на границе этой гранулы идёт формирование костной ткани. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

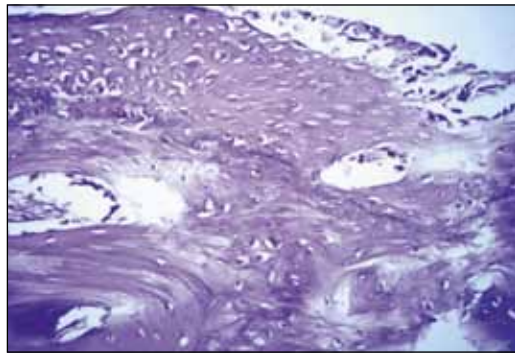


Рис. 7. Новообразованная компактизирующаяся костная ткань в дефекте с увеличенным количеством остеоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 400.

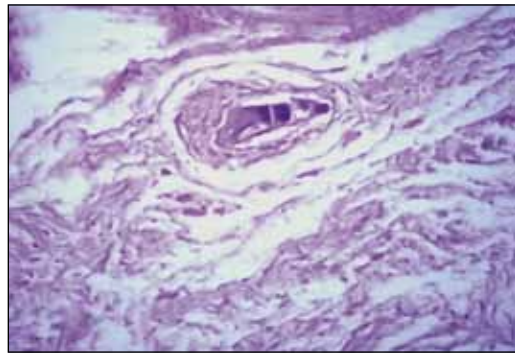


Рис. 8. Мелкие гранулы ГАП, окружённые соединительнотканной капсулой. Окраска гематоксилином и эозином x 400.

костной тканью, в которой костные балки компактизируются, но, в отличие от интактной кости, она богата клеточными элементами (остеоцитами) (рис. 7). В этой кости гранулы ГАП уже не обнаруживаются, однако в соединительной ткани на краю дефекта видны резко уменьшившиеся в размере гранулы ГАП, окружённые соединительнотканной капсулой (рис. 8).

IV группа. β -трикальцийфосфатная керамика+гидроксиапатит
1 месяц после операции.

Костная полость заполнена в основном новообразованными созревающими костными балками и в меньшей степени грубоволокнистой соединительной тканью. Отмечаются также участки кровоизлияний (рис. 9). Гранул ГАП в данном препарате не обнаружено.

2 месяца после операции.

В препарате не обнаруживается бывшей костной полости, имеется лишь зуб в окружающей костной ткани. Если препарат взят на месте бывшего дефекта,

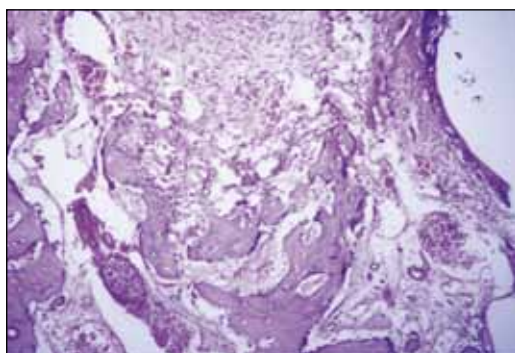


Рис. 9. Вверху – участки грубоволокнистой соединительной ткани, внизу – формирующиеся новообразованные костные балки. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

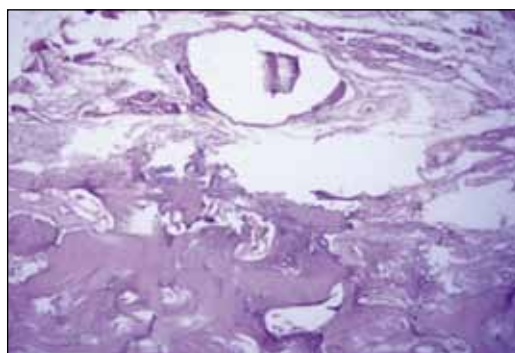


Рис. 10. Вверху – гранулы ГАП, видны лишь частично в полости, окружённой соединительнотканной капсулой. Внизу – созревающая и компактизирующаяся костная ткань. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

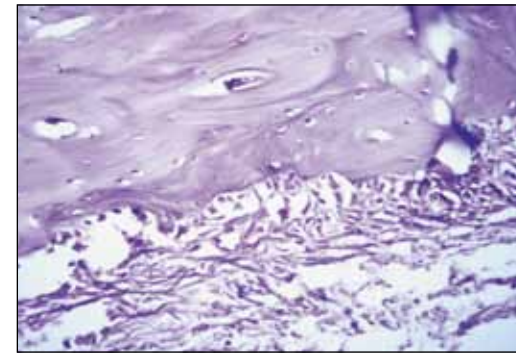


Рис. 11. Вверху – зрелая компактная костная ткань с типичной структурой гаверсовых каналов. Внизу – грубоволокнистая соединительная ткань. Окраска гематоксилином и эозином x 400.

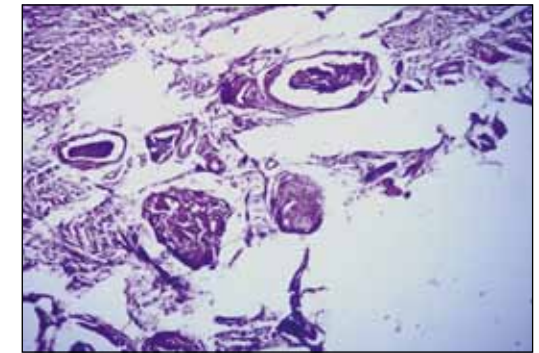


Рис. 12. Многочисленные гранулы ГАП, окружённые соединительнотканной капсулой, в мягких тканях десны. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

это означает, что дефект заполнен зрелой костной тканью, которая уже не отличается от интактной.

V группа. β -трикальцийфосфатная керамика+гидроксиапатит+траумель С.
1 месяц после операции.

Костный дефект частично заполнен фиброзной грубоволокнистой соединительной тканью, но в основном — зрелой компактизирующейся костной тканью. В кости гранулы ГАП отсутствуют. В фиброзной ткани остаются гранулы, окру-

жённые соединительнотканной капсулой (рис. 10).

2 месяца после операции.

Большая часть полости замещена компактизирующейся зрелой костной тканью (рис. 11). В рыхлой соединительной ткани десны остаются ещё гранулы ГАП, окружённые соединительнотканной капсулой (рис. 12). По-видимому, гранулы ГАП во время операции частично выпадают из костного дефекта.

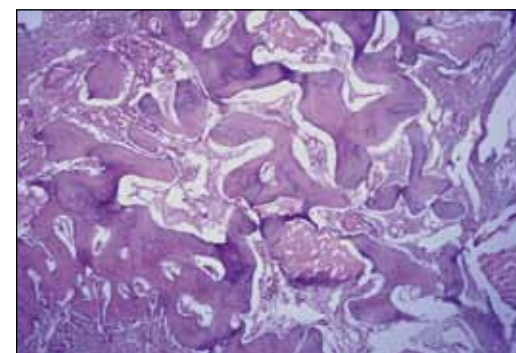


Рис. 13. Зрелые костные балки и гранулы ГАП между ними. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

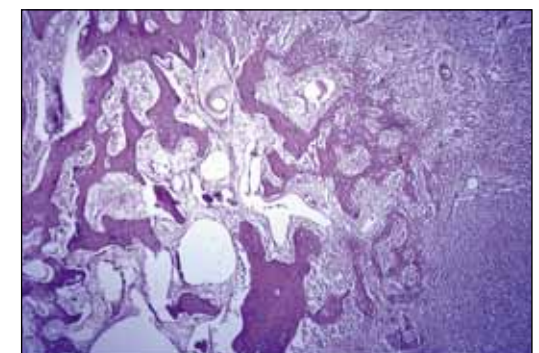


Рис. 14. Слева – зрелая губчатая кость, справа – фиброзная грубоволокнистая ткань, между ними незрелые костные балки и гранулы ГАП с лизисом содержимого. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x 200.

VI группа. β -трикальцийфосфатная керамика + гидроксипатит + траумель С + богатая тромбоцитами плазма.

1 месяц после операции.

Практически вся полость бывшего костного дефекта заполнена новообразованной губчатой костью, состоящей из зрелых трабекул. Между трабекулами виден костный мозг и остающиеся гранулы ГАП (рис. 13).

2 месяца после операции.

Полость бывшего дефекта замещена в основном зрелой губчатой костью, среди которой остаются лишь небольшие гранулы ГАП. При этом ГАП в гранулах подвергается лизису и резорбции (рис. 14). Частично полость занята фиброзной грубоволокнистой тканью. Между этими двумя тканями (т.е. на краю формирующейся губчатой кости) видны незрелые костные балки.

Выводы

Гистологическое изучение дефектов костной ткани альвеолярных дуг челюстей кроликов, заполненных остеопластическими материалами (β -трикальцийфосфатной керамики, гидроксипатита (ГАП), траумель С, богатой тромбоцитами плазмой и сочетанием этих материалов) в динамике заживления дефектов (1 и 2 мес.) позволяет определить особенности репаративных процессов.

В контрольной группе, где костные дефекты были заполнены кровяным сгустком (аутокровью), репаративный остеогенез через 1 месяц после операции только начинался. Дефект был заполнен в основном грубоволокнистой остеогенной соединительной тканью и только на краях появлялись незрелые остеонидные трабекулы. Через 2 месяца репаративный остеогенез усиливался: большая часть

дефекта была заполнена ещё незрелыми костными трабекулами.

При использовании β -трикальцийфосфатной керамики (2 группа опытов) уже через 1 месяц репаративный остеогенез имел такой же характер, как на 2 месяца в контрольной группе. Через 2 месяца в этой группе большая часть дефекта была заполнена относительно зрелой костной тканью, которая местами компактизируется.

Применение ГАП через 1 месяц в меньшей степени усиливает остеогенез, чем в случае β -трикальцийфосфатной керамики, так как на этот срок пространство ещё занято гранулами ГАП. Однако костные трабекулы и в этот срок более зрелые, чем в контроле. Через 2 месяца костная ткань в бывшем дефекте по зрелости уже не отличается от предыдущей группы.

Сочетание β -трикальцийфосфатной керамики с ГАП (4 группа опытов), а также сочетание этих материалов с траумель С (5 группа) ускоряют остеогенез в дефекте кости как через 1, так и через 2 месяца наблюдения. Наибольшая активность репаративного остеогенеза отмечается в 6 группе опытов, где те же материалы сочетались с богатой тромбоцитами плазмой. У животных этой группы уже через 1 месяц костный дефект был заполнен зрелой губчатой костью, в которой ещё обнаруживаются гранулы ГАП, а ко второму месяцу опыта ГАП уже, в основном, резорбируется.

Список литературы

1. **Зорян Е.В., Зорян А.В.** Гомеопатический метод лечения и возможность его использования в стоматологической практике // Клиническая стоматология. 2002. № 3. С.48-52.
2. **Зорян Е.В.** Очерки по гомеопатии для

стоматологов. М. Арнебия. 2005. 160 с.

3. **Балин В.Н., Черныш В.Ф.** Опыт клинической апробации материалов на основе биокерамики в стоматологии // Стоматология. 1996. № 5 С. 45-46.
4. **Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M., Schimmel S.R., Strauss J.E., Georgeff K.R.** Platelit-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg // Oral med Oral Pathol

Oral Radiol Endod.1998;85:638-646.

5. **Landesberg L.A. et al.** PVP-Observed Private Practice Protocol (Harvest Technologies Corp., Plymouth MA) // G. Oral Maxillofac Surg. 2000;58:247.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева. М.: Профиль. 2С. 2010. 358 с.

Experimental modeling with the aim of histology studying of bone defects of alveolar arches of rabbits in dynamics by filling them with osteoplastic materials

R.V. Martirosyan, A.B. Shehter, V.N. Balin, G.D. Kapanadze, L.V. Vinokurova

Histologic studying of the received materials in experiment on laboratory animals (rabbits) by comparative efficiency of the separate and combined application nanostructure β -Ca₃(PO₄)₂ ceramics and a hydroxyapatite (a mineral component), a complex homeopathic preparation Traumel C (a natural component) and rich thrombocytes plasmas from autoblood has been spent.

Key words: efficiency of a combination of osteomaterials, Traumel C and rich thrombocytes plasmas, rabbits.

Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на биоэнергетику и перекисное окисление липидов печени при экспериментальной патологии, вызванной парацетамолом

В.В. Удут¹, А.И. Венгеровский², Д.А. Коршунов², Н.Н. Каркищенко³

¹ – НИИ фармакологии СО РАМН, Томск

² – Сибирский государственный медицинский университет, Томск

³ – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: чл.-корр. РАМН проф. Удут Владимир Васильевич
udutv@mail.ru

Изучено влияние гепатопротекторов фосфолипидной структуры — эссенциале, эплира и их комбинаций с янтарной кислотой — на функциональное состояние, перекисное окисление липидов и биоэнергетику печени крыс при экспериментальной интоксикации парацетамолом. Препараты оказывают антиоксидантное действие, в крови уменьшают уровень общего и непрямого билирубина, активность aminотрансфераз и щелочной фосфатазы. Парацетамол разобщает окислительное фосфорилирование и ингибирует дыхательную активность митохондрий печени, эссенциале и эплир повышают сопряженность окисления и синтеза АТФ, в сочетании с янтарной кислотой устраняют ингибирующее действие парацетамола на кинетические параметры дыхательной цепи митохондрий печени.

Ключевые слова: экспериментальная интоксикация парацетамолом, эссенциале, эплир, комбинации с янтарной кислотой, печень.

Более 1000 лекарственных средств обладают потенциальной гепатотоксичностью [9, 10]. В частности, ненаркотический анальгетик парацетамол может вызывать гепатит и даже фульминантную печеночную недостаточность, при которой возникают экстренные показания к трансплантации печени [12, 13].

Основными лекарственными средствами, восстанавливающими метаболизм и функциональное состояние печени при ее токсической патологии, являются гепатопротекторы [1, 11]. Гепатопротекторы фосфолипидной природы замещают поврежденные фосфолипиды в мембранах гепатоцитов, регулируют проницаемость ионных каналов, активность мембраносвязанных ферментов и

циторецепторов, поддерживают процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях, улучшают антиоксидантную и экскреторную функции печени [3].

В связи с этим, представляет интерес изучить терапевтический эффект гепатопротекторов фосфолипидной природы — эссенциале (фосфатидилхолин из соевых бобов) и эплира (комплекс фосфолипидов, сульфолипидов, тиолов, каротиноидов илового осадка) [7] на биоэнергетику и процессы липопероксидации в печени при интоксикации парацетамолом. Регулятор энергетического обмена — янтарная кислота, оптимизируя процессы энергообеспечения, повышает продукцию АТФ и препятствует деградации митохондрий [15].

Материалы и методы

Эксперименты проводили в осенне-зимний период на 60 нелинейных белых крысах-самцах массой 200–220 г, выращенных в конвенциональных условиях в клинике лабораторных животных НИИ фармакологии СО РАМН. Исследования выполняли в соответствии с рекомендациями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [5, 6].

Для моделирования поражения печени животным вводили в желудок в течение 2 сут парацетамол в дозе 2,5 г/кг (ЛД₁₀) в виде суспензии на 1% крахмальной слизи. Эссенциале (Авентис, Германия, 80 мг/кг), эплир (30 мг/кг) и их комбинации с янтарной кислотой (50 мг/кг) с 3-х сут эксперимента (после завершения интоксикации парацетамолом) вводили в желудок на протяжении 12 сут. Эссенциале применяли в ампульном растворе, эплир и янтарную кислоту — в виде суспензии на 1% крахмальной слизи. Дозы препаратов являются эффективными терапевтическими и были установлены в ранее проведенных экспериментах [7, 15]. Контрольные животные получали дистиллированную воду или крахмальную слизь. Крысы декапитировали под эфирным наркозом через сутки после последнего введения препаратов или их растворителей. Для исследований использовали сыворотку крови и гомогенат печени.

В сыворотке крови определяли содержание общего белка, общего и конъюгированного билирубина, активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) [4]. В гомогенате печени исследовали активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) по скорости образования спонтанного и аскорбатзависимого малонового диальдегида

(МДА), содержание диеновых конъюгатов и оснований Шиффа [2].

Функциональное состояние митохондрий гомогената печени крыс изучали полярографическим методом (полярограф Эксперт-001, Россия) по скорости потребления кислорода в различных метаболических состояниях [15]. В качестве субстратов окисления использовали 1·10⁻³ М сукцината, по 3·10⁻³ М глутамата и малата. Для анализа вклада реакций переаминирования и ФАД-зависимого дыхания применяли ингибитор сукцинатдегидрогеназы (СДГ) малонат (2·10⁻³ М) и ингибитор aminотрансфераз аминосукцинат (2·10⁻³ М).

Регистрировали скорость дыхания митохондрий до (V_{4n}), во время (V_3) и после (V_{4o}) цикла фосфорилирования АДФ, добавленного в количестве 130 мкмоль. Во всех измерениях абсолютные значения скоростей потребления кислорода митохондриями представлены в нг атомарного кислорода / мин / мг белка. Для оценки энергетического статуса рассчитывали коэффициент сопряженности окислительного фосфорилирования (АДФ/О).

Статистическую обработку результатов проводили методом парных сравнений с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни [8] при вероятности ошибочного вывода, не превышающей 5% ($p \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Ненаркотический анальгетик парацетамол (ацетаминофен) в печени образует конъюгаты с глюкуроновой (60% дозы) и серной (35%) кислотами. Только 5% дозы парацетамола окисляется изоферментами цитохрома *P-450 1A2, 2E1, 3A4* с образованием свободных радикалов и электрофильных метаболитов. Эти продукты обезвреживаются конъюгацией

с восстановленным глутатионом. При поступлении в организм парацетамола в токсической дозе (10-15 г) значительная часть молекул преобразуется в свободные радикалы, которые инициируют ПОЛ, снижают трансмембранный потенциал митохондрий, вызывают формирование гигантских пор в их мембране,

увеличивают образование ядерного фактора (*NF-κB*). Последний стимулирует продукцию цитокинов – интерлейкина-1, фактора некроза опухоли-α, хемоаттрактанта-1 макрофагов [16].

В наших экспериментах (табл. 1) цитолитическое действие парацетамола сопровождалось выходом в кровь из па-

ренхимы печени АлАТ и АсАТ с ростом активности в 4,3-5,2 раза. Развивался также синдром холестаза с увеличением в крови содержания общего билирубина в 4,3 раза, свободного билирубина – в 13,5 раза, активности ЩФ – в 1,4 раза. Коэффициент глюкуронирования билирубина (отношение количества связанного билирубина к его общему количеству) уменьшался до 0,67 (в норме – 0,90). Содержание в крови белка становилось в 1,8 раза ниже, чем у интактных животных.

При интоксикации парацетамолом в гомогенатах печени образование спонтанного и аскорбатзависимого МДА ускорялось в 2-2,2 раза. Содержание диеновых конъюгатов и оснований Шиффа увеличивалось в 3,2-3,4 раза (табл. 1).

Терапия эссенциале, эплиром и этими гепатопротекторами совместно с янтарной кислотой нормализовала в крови активность АлАТ, ЩФ, содержание белка, свободного билирубина. При введении гепатопротекторов совместно с янтарной кислотой также не отличались от нормы активность АсАТ и содержание общего билирубина, под влиянием эссенциале и эплира, примененных в виде монотерапии, эти показатели становились в 1,9-2,9 раза меньше, чем при интоксикации парацетамолом. Коэффициент глюкуронирования билирубина повышался до 0,89-0,91 (табл. 1).

Гепатопротекторы самостоятельно и в комбинации с янтарной кислотой тормозили активацию ПОЛ при экспериментальном поражении печени парацетамолом: образование спонтанного и аскорбатзависимого МДА замедлялось в 1,3-1,9 раза, количество диеновых конъюгатов и оснований Шиффа снижалось в 1,7-2,9 раза (табл. 1).

Интоксикация парацетамолом сформировала в печени состояние дезэнергиза-

ции митохондрий по кинетическому типу, для которого характерно несоответствие динамики расхода и синтеза макроэргов в условиях повышенной нагрузки на систему энергопродукции (табл. 2). Скорости окисления эндогенных субстратов до (V_{4n}), во время (V_3) и после (V_{4o}) цикла фосфорилирования АДФ становились на 26-73% больше, чем в норме. В эксперименте с окислением экзогенного сукцината скорость дыхания в состоянии V_3 значимо не отличалась от нормы, скорости дыхания в состояниях V_{4n} и V_{4o} возрастали на 19-21%. При окислении НАД-зависимых субстратов митохондриями поврежденной парацетамолом печени скорости дыхания повышались на 15-35%. При окислении всех субстратов коэффициент АДФ/О снижался (на 16-33%). После добавления малоната и ингибитора аминотрансфераз аминоксидата в среду инкубации митохондрий не регистрировалось типичное для интактных митохондрий увеличение вклада окисления эндогенного сукцината и реакций переаминирования в дыхательную активность.

Таким образом, парацетамол нарушает дыхательную функцию митохондрий на фоне повышенной потребности в энергоресурсах. Это сопровождается активацией контролируемого дыхания в сочетании с умеренным ответом на нагрузку после добавления АДФ. Из митохондрий через поврежденные парацетамолом мембраны в цитоплазму выходят в первую очередь СДГ, затем I комплекс дыхательной цепи. Наименьшее токсическое влияние парацетамол оказывает на аскорбатзависимый комплекс дыхательной цепи.

Применение эссенциале на фоне интоксикации парацетамолом повышало сопряженность окисления и фосфо-

Таблица 1

Влияние гепатопротекторов на биохимические показатели крови и перекисное окисление липидов печени при экспериментальной интоксикации парацетамолом ($\bar{X} \pm S\bar{x}$; n=10)

Показатели	Интактные животные	Парацетамол	Парацетамол +			
			Эссенциале	Эссенциале + янтарная кислота	Эплир	Эплир + янтарная кислота
Сыворотка крови						
АлАТ, мккат/л	0,06±0,01	0,26±0,04 ¹	0,08±0,02 ²	0,07±0,01 ²	0,05±0,01 ²	0,06±0,01 ²
АсАТ, мккат/л	0,06±0,02	0,31±0,06 ¹	0,14±0,03 ^{1,2}	0,11±0,02 ²	0,16±0,02 ^{1,2}	0,10±0,02 ²
Щелочная фосфатаза, Е/л	269,8±17,5	378,1±15,1 ¹	312,9±20,3 ²	301,9±15,8 ²	315,1±10,1 ²	290,2±12,2 ²
Общий белок, г/л	69,7±8,1	38,6±3,7 ¹	67,8±5,2 ²	66,3±4,2 ²	68,1±3,7 ²	69,1±4,1 ²
Общий билирубин, мкмоль/л	14,0±1,1	60,6±1,0 ¹	20,9±1,3 ^{1,2}	18,1±2,2 ²	23,4±1,5 ^{1,2}	17,1±1,5 ^{2,3}
Непрямой билирубин, мкмоль/л	1,5±0,2	20,3±2,1 ¹	2,3±0,4 ²	1,7±0,2 ²	2,2±0,4 ²	1,5±0,3 ²
Гомогенат печени						
МДА спонтанный, нмоль/мг белка·мин	1,6 ± 0,3	3,2± 0,4 ¹	1,7 ± 0,2 ²	1,6 ± 0,3 ²	1,6 ± 0,3 ²	1,5 ± 0,2 ²
МДА аскорбатзависимый, нмоль/мг белка·мин	4,0±0,6	8,6±0,5 ¹	4,5±0,2 ²	4,9±0,7 ²	4,8±0,6 ²	4,2±0,2 ²
Диеновые конъюгаты, нмоль/мг липидов	0,9±0,1	3,1±0,2 ¹	1,5±0,2 ^{1,2}	1,2±0,1 ²	1,4±0,3 ²	1,3±0,2 ²
Основания Шиффа, нмоль/мг липидов	1,2±0,2	3,8±0,4 ¹	2,2±0,2 ^{1,2}	1,3±0,2 ²	1,9±0,4 ²	1,4±0,2 ²

Примечание. Статистически значимые отличия при $p \leq 0,05$ по сравнению с: ¹ – интактными животными; ² – парацетамолом; ³ – эплиром.

рилирования в митохондриях печени крыс (коэффициент АДФ/О становился больше на 11-24%), хотя кинетические параметры тканевого дыхания почти не отличались от значений, регистрируемых у нелеченных животных. В митохондриях печени крыс при окислении эндогенных субстратов скорости поглощения кислорода в состояниях активного фосфорилирования добавленной АДФ и отдыха повышались на 10-13% ($p < 0,05$). При окислении сукцината скорость поглощения кислорода в состоянии V_{40} возрастала на 9% ($p < 0,05$). При окислении НАД-зависимых субстратов скорость дыхания митохондрий печени увеличивалась в состоянии V_{40} на 11% ($p < 0,05$). После добавления малоната и аминоксациетата усиливались окисление эндогенного сукцината и реакции переаминирования. Этот факт свидетельствует о частичном восстановлении активности СДГ (табл. 2).

При совместном введении эссенциале с янтарной кислотой митохондрии функционировали на высоком уровне, несмотря на возросшую нагрузку на систему энергообеспечения. Скорости дыхания при окислении эндогенных субстратов митохондриями печени повышались на 9-24% ($p < 0,05$) по сравнению со скоростями у животных, получавших только парацетамол. В среде инкубации с сукцинатом скорость дыхания митохондрий в состоянии V_{4n} снижалась на 9% ($p < 0,05$), скорости дыхания в состояниях V_3 и V_{40} возрастали на 9-18% ($p < 0,05$). Скорость окисления митохондриями печени НАД-зависимых субстратов в состоянии V_{40} превышала на 18% скорость дыхания у животных с интоксикацией парацетамолом. В тесте с внесением малоната и аминоксациетата регистрировался рост потребления кислорода митохондриями

печени в состояниях V_3 и V_{40} на 9-18% ($p < 0,05$). Коэффициент АДФ/О увеличился на 10-28% (табл. 2).

При введении эплира на фоне интоксикации парацетамолом биоэнергетика печени также улучшалась. Большинство функциональных показателей дыхания митохондрий значительно изменялось в сторону нормы. Скорости дыхания при окислении эндогенных субстратов, экзогенного сукцината и НАД-зависимых субстратов снижались на 12-40%. Коэффициент АДФ/О возрастал на 17-25%. В результате ингибиторного анализа установлен вклад окисления эндогенного сукцината в продукцию АТФ без активации процессов переаминирования (табл. 2).

Применение эплира совместно с янтарной кислотой на фоне патологии печени, вызванной парацетамолом, повышало эффективность функционирования митохондрий печени. Скорости дыхания митохондрий при окислении эндогенных субстратов в состояниях покоя, активного фосфорилирования и отдыха снижались на 10-49%. При утилизации сукцината и смеси НАД-зависимых субстратов скорости дыхания в состояниях V_{4n} и V_{40} уменьшались на 8-25% ($p < 0,05$) относительно скоростей при патологии печени, вызванной парацетамолом. Коэффициент АДФ/О возрастал на 9-24%. Малонат и аминоксациетат тормозили дыхание в состоянии V_{40} на 12-14% ($p < 0,05$), при этом коэффициент АДФ/О повышался на 11-22% (табл. 2).

Таким образом, при интоксикации парацетамолом гепатопротекторы фосфолипидной природы оказывают выраженный антиоксидантный эффект, уменьшают цитолиз гепатоцитов, холестаза и восстанавливают дыхательную функцию митохондрий печени. Как известно, целостность внутренней мем-

Влияние гепатопротекторов на функциональное состояние митохондрий печени при экспериментальной интоксикации парацетамолом ($\bar{X} \pm S\bar{X}$; $n=10$)

Показатели	Интактные животные	Парацетамол	Парацетамол +			
			Эссенциале	Эссенциале + янтарная кислота	Эплир	Эплир + янтарная кислота
Окисление эндогенных субстратов						
V_{4n}	24,19±0,11	38,50±0,25 ¹	39,45±0,45 ¹	41,85±0,74 ^{1,2}	32,51±0,66 ¹⁻³	29,80±0,22 ^{1,2}
V_3	43,44±0,51	55,01±1,22 ¹	61,38±0,88 ^{1,2}	98,15±0,89 ¹⁻³	46,53±0,75 ^{2,3}	49,67±0,56 ^{1,2}
V_{40}	20,13±0,73	34,83±0,65 ¹	38,47±0,76 ^{1,2}	40,91±0,66 ^{1,2}	20,77±0,47 ^{2,3}	17,78±0,09 ^{1,2,4}
АДФ/О	3,13 ± 0,03	2,10 ± 0,06 ¹	2,60 ± 0,01 ^{1,2}	2,20 ± 0,05 ^{1,3}	2,63 ± 0,04 ^{1,2}	2,60 ± 0,05 ^{1,2}
Окисление сукцината						
V_{4n}	52,09± 1,52	62,06±1,11 ¹	59,60±1,31 ¹	56,21±1,21 ²	50,57±1,11 ^{2,3}	55,53±1,28 ^{2,4}
V_3	97,36± 1,14	101,72±1,12	104,15±1,44 ¹	119,67±1,95 ¹⁻³	89,79±1,42 ¹⁻³	115,31±1,67 ^{1,2,4}
V_{40}	45,95± 0,11	54,39±1,03 ¹	58,87±1,12 ^{1,2}	59,06±1,41 ^{1,2}	41,99±1,32 ^{2,3}	47,41±1,06 ^{2,4}
АДФ/О	2,15± 0,10	1,80±0,05 ¹	2,00±0,05 ²	1,90±0,06 ¹	1,93±0,04 ^{1,2}	2,10±0,06 ^{2,4}
Окисление НАД-зависимых субстратов (малат и глутамат)						
V_{4n}	32,04±0,06	43,39±0,55 ¹	43,99±0,84 ¹	44,97±0,44 ¹	36,66±0,12 ¹⁻³	39,83±0,54 ^{1,2}
V_3	68,35±0,80	79,05±0,78 ¹	83,48±0,75 ¹	84,11±0,63 ¹	67,88±0,55 ^{2,3}	83,47±0,75 ^{1,4}
V_{40}	30,51±0,12	39,72±0,49 ¹	44,09±0,32 ^{1,2}	47,00±0,77 ^{1,2}	26,19±0,14 ^{1,2,3}	29,80±0,19 ²
АДФ/О	2,68±0,02	2,20±0,05 ¹	2,50±0,10 ^{1,2}	2,80±0,05 ^{2,3}	2,73±0,04 ^{2,3}	2,40±0,07 ^{1,2,4}
Окисление НАД-зависимых субстратов с малонатом						
V_{4n}	26,45±0,20	43,15±0,45 ¹	42,48±0,21 ¹	42,13±0,21 ¹	31,61±0,24 ¹⁻³	37,93±0,55 ^{1,2,4}
V_3	58,83±0,95	68,38±0,88 ¹	72,14±0,55 ¹	76,94±0,55 ^{1,2}	61,31±0,77 ^{2,3}	73,14±0,87 ^{1,4}
V_{40}	25,37±0,15	40,70±0,65 ¹	40,15±0,46 ¹	44,83±0,43 ^{1,2}	24,38±0,31 ^{2,3}	31,15±0,22 ^{1,2,4}
АДФ/О	2,90±0,05	2,20±0,05 ¹	2,70±0,11 ^{1,2}	2,60±0,04 ^{1,2}	2,53±0,05 ^{1,2,3}	2,70±0,05 ^{1,2,4}
Окисление НАД-зависимых субстратов с аминоксациетатом						
V_{4n}	27,99±0,07	42,17±0,24 ¹	47,25±0,96 ^{1,2}	45,92±0,12 ^{1,2}	30,88±0,11 ^{2,3}	39,01±0,15 ^{1,4}
V_3	64,49±0,60	76,44±0,66 ¹	84,04±0,76 ^{1,2}	89,85±0,55 ¹⁻³	69,98±,86 ^{1,2,3}	89,79±0,96 ^{1,2,4}
V_{40}	29,07±0,09	40,95±0,98 ¹	38,15±0,84 ¹	42,67±0,31 ^{1,3}	26,91±0,13 ^{2,3}	32,51±0,77 ^{2,4}
АДФ/О	2,75±0,05	2,30±0,06 ¹	2,60±0,05 ²	2,50±0,06 ^{1,2}	2,36 ± 0,10 ^{1,3}	2,55±0,10 ^{1,2,4}

Примечание. Статистически значимые отличия при $p \leq 0,05$ по сравнению с: 1 – интактными животными; 2 – парацетамолом; 3 – эссенциале; 4 – эплиром. Размерность единиц: скорости дыхания (V_{4n} , V_3 , V_{40}) – нанограмм-атом О₂/мин/мг белка митохондрий.

браны митохондрий, создаваемая фосфолипидами, является обязательным условием генерации электрохимического потенциала, необходимого для активации АТФ-азы и синтеза АТФ. Фосфолипиды проницаемы для протонов, что обеспечивает «подток» протонов на АТФ-азу с ро-

стом напряжения для конформационных изменений фермента [14]. Не исключено, что фосфатидилхолин эссенциале и фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сульфоллипиды эплира способствуют реструктуризации мембраны митохондрий в участке локализации АТФ-азы.

Янтарная кислота усиливает протективное действие фосфолипидов в результате активации дыхательной функции митохондрий по кинетическому типу. Под влиянием янтарной кислоты процессы окисления переключаются от полного цикла Кребса на преимущественное окисление наиболее мощного субстрата – сукцината [15]. Это значительно повышает интенсивность синтеза АТФ и поставку водорода и электронов в дыхательную цепь митохондрий. Активация биоэнергетики печени под влиянием гепатопротекторов фосфолипидной структуры способствует ускоренной детоксикации парацетамола и улучшению процессов регенерации паренхимы печени.

Выводы

1. Гепатопротекторы фосфолипидной структуры — эссенциале, эплир и их комбинации с янтарной кислотой — при экспериментальной интоксикации парацетамолом в печени препятствуют активации перекисного окисления липидов, в крови уменьшают уровень общего и непрямого билирубина, активность аминотрансфераз и щелочной фосфатазы.

2. Парацетамол при экспериментальной интоксикации снижает сопряженность окислительного фосфорилирования и ингибирует дыхательную активность митохондрий печени.

3. Эссенциале и эплир при интоксикации парацетамолом повышают сопряженность окисления и синтеза АТФ, в сочетании с янтарной кислотой устраняют ингибирующее действие парацетамола на кинетические параметры дыхательной цепи митохондрий печени.

Список литературы

1. Буеверов А.О. Возможности лечения лекарственных поражений печени в

условиях необходимости приема гепатотоксичных препаратов // Лечащий врач. 2009. № 2. С. 40-42.

2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Медицина 1972. 258 с.
3. Грищенко Е.Б., Щекина М.И. Применение эссенциальных фосфолипидов в лечении острых и хронических заболеваний печени // Cons. med. 2011. № 8. с. 38-41.
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Минск: Беларусь. 2000. 363 с.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина. 2005. 832 с.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль – 2С. 2010. 358 с.
7. Саратиков А.С., Буркова В.Н., Венгеровский А.И., Кураколова Е.А. Новые гепатопротективные и противовоспалительные препараты пеллоидов. Томск: Изд-во Том. ун-та. 2004. 178 с.
8. Хафизьянова Р.Х. Бурькин И.М., Алексеева Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной фармакологии. – Казань: Медицина. 2006. 374 с.
9. Хомерики С.Г. Патогенетические механизмы и морфологические проявления лекарственных поражений печени // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. 2011. № 6. С. 11-21.
10. Шульпекова Ю. Лекарственные поражения печени // Врач. 2010. № 7. с. 13-18.

11. Яковенко Э.П., Яковенко А.В., Иванов А.Н. и др. Лекарственно-индуцированные поражения печени. Диагностика и лечение // Лечащий врач. 2011. № 2. С. 16-20.
12. Ghosh A., Sil P. Protection of acetaminophen induced mitochondrial dysfunctions and hepatic necrosis via Akt-NF-kappaB pathway: role of a novel protein // Chem. Biol. Interact. 2009. 177. P. 96-106.
13. Jaeschke H., Bajt M. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death // Toxicol. Sci. 2006. 89. P. 31-41.
14. Jones D., Lemasters J., Han D. et al. Mechanisms of pathogenesis in drug hepatotoxicity putting the stress on mitochondria // Mol. Interv. 2010. 10. P. 98-111.
15. Kondrashova M., Zakharchenko M., Khunderyakova N. Preservation of the in vivo state of mitochondrial network for ex vivo physiological study of mitochondria // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2009. 41. P. 2036-2050.
16. Mahadevan S., McKiernan P., Davies P et al. Paracetamol induced hepatotoxicity // Arch. Dis. Child. 2006. 91. P. 598-603.

Influence of hepatoprotective agents of phospholipids structure on liver bioenergetics and lipoperoxidation in experimental liver pathology caused by paracetamol

V.V. Udut, A.I. Vengerovsky, D.A. Korshunov, N.N. Karkischenko

Influence of hepatoprotective agents of phospholipids structure essentielle, eplir and its combinations with amber acid on rats liver functional state, lipoperoxidation and bioenergetics in experimental paracetamol intoxication was investigated. These agents demonstrated antioxidant action, decreased the common and indirect bilirubine blood content, aminotransferase and alkaline phosphatase activity. Paracetamol uncoupled the substrate oxidation with ADP phosphorylation and inhibited the respiratory activity of liver mitochondrions. Essentielle and eplir increased the coupling of oxidation with ATP synthesis, in combination with amber acid improved kinetic characteristics of liver mitochondrions.

Key words: experimental paracetamol intoxication, essentielle, eplir, combinations with amber acid, liver.



Надлежащая лабораторная практика (GLP): персонал и управление экспериментальной работой в Научном центре биомедицинских технологий РАМН

А.О. Ревякин, Е.Л. Матвеев, Г.Д. Капанадзе

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович scbmt@yandex.ru

На примере НЦБМТ РАМН рассмотрены требования к персоналу и менеджменту при проведении экспериментов на основе требований GLP.

Ключевые слова: надлежащая лабораторная практика (GLP), персонал, менеджмент, экспериментальная работа.

Из фундаментальных основ GLP

Персонал

Управленческий персонал GLP лаборатории должен составлять не менее 15% от численности всего руководства. Данные сотрудники являются необходимым звеном системы поддержания качества работы. Без лиц, отвечающих за все процессы экспериментальной работы, и вовлечения в эксперимент всего персонала GLP как система не сможет существовать. Таким образом, системы управления и организации экспериментальной работы являются критическим элементом системы GLP лаборатории. Без них невозможно обеспечить сам дух применения системы GLP в экспериментальной практике.

В НЦБМТ РАМН вопросами кадровой политики занимаются отдел кадров, кадровая комиссия, Ученый совет и заведующие лабораториями, которые следят за тем, чтобы на всех должностях находились люди, обладающие соответствующим уровнем знаний,

умений и навыков. До назначения на должность каждый новый сотрудник проходит собеседование в кадровой комиссии, а научные сотрудники избираются на должность на заседании Ученого совета в соответствии с объявленным в «Медицинской газете» конкурсом при обязательном тайном голосовании. Такой порядок замещения вакантных должностей соответствует Трудовому кодексу РФ, Уставу РАМН и Уставу Центра.

Из фундаментальных основ GLP

Качественная наука – это

- Тщательное определение дизайна и параметров эксперимента.
- Использование известных, общепринятых или инновационных научных методик.
- Контроль и документация экспериментальных данных, а также описание окружающей среды эксперимента.
- Тщательная и полная оценка записей результатов.

- Превращение результатов в часть общедоступных научных знаний.

До начала любого эксперимента в Центре проводится большая подготовительная работа, первым этапом которой является четкое формулирование цели исследований. Исходя из целей, формулируют задачи, выбирают методы исследований, наиболее подходящих лабораторных животных, а также способы обработки результатов и их возможной интерпретации. При выборе лабораторных животных исследователь должен быть уверен в том, что выбранный вид животных наиболее полно сможет обеспечить результаты экспериментальной работы с учетом генетических характеристик, категории и статуса, характеристик содержания, кормления и поения. Животных должно быть достаточное количество для получения достоверных результатов, однако их не должно быть чрезмерно много. В эксперименте необходимо исключить боль и страдания животных, тщательно соблюдать все морально-этические принципы. В НЦБМТ РАМН этими вопросами занимается биоэтическая комиссия, созданная Приказом по Центру. Комиссия следит в том числе и за такими вопросами как наиболее полное использование животных в эксперименте, что включает в себя вопросы проведения всех возможных тестов и исследований, даже если они не являются основной целью данного эксперимента, но могут быть использованы в дальнейшей работе. Таким образом, создаются базы и банки данных и знаний, облегчающие дальнейшие разработки, а также уменьшающие количество животных для эксперимента. Все необходимые образцы консервируются. В лабораторных журналах проводятся записи. Особое внимание при проведении экспериментальной работы необходимо обращать на поведение животных. В НЦБМТ РАМН мониторинг состояния животного, находящегося в эксперименте, про-

водится постоянно с принятием необходимых мер при изменении поведения. Поведение животных отражается в листе наблюдений. Все действия в НЦБМТ РАМН проводятся на основании стандартных операционных процедур (СОПов), которые разрабатываются, хранятся, распространяются и обновляются в соответствии с принятыми и утвержденными Ученым советом Центра правилами. При необходимости проводятся консультации с участием других научных сотрудников, ветеринаров, специалистов по животным, в том числе и из других организаций.

Точки окончания эксперимента должны быть определены исследователем заранее. Смерть животного не должна изначально планироваться как точка окончания эксперимента. Обычно животных используют только в одном эксперименте. Однако в некоторых случаях можно повторно использовать животных, чтобы снизить общее количество животных в проекте и оградить от боли и страданий других животных. В этих случаях животных используют в процедурах, не связанных с болью и страданиями, или процедурах с небольшим биологическим стрессом, например изучение корма с последующим взятием крови или неинвазивных процедур. От одного эксперимента до следующего должно пройти достаточное количество времени для восстановления животного.

В НЦБМТ РАМН указанные принципы тщательно исполняются. Экспериментаторы ведут журналы наблюдений, ежедневно фиксируя в них проводимые экспериментальные процедуры, кормление, поение, изменение состояния и поведения животных. Результаты экспериментов оформляются в виде отчетов лабораторий Центра, а также сводятся в единый отчет о выполнении научно-исследовательской работы и экспериментальной работы Центра. Результаты публикуются в научных журналах, а также докладываются на различных научных конференциях. Осо-

бую роль в процессе превращения результатов в общедоступные знания играет журнал «Биомедицина», учрежденный НЦБМТ РАМН в 2005 г., его электронная версия находится в открытом доступе на сайте Центра (www.sebmt.ru). Ежегодная научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование», проводимая в НЦБМТ РАМН с участием зарубежных ученых, способствует распространению знаний и проведению научной дискуссии. Ученый совет НЦБМТ РАМН регулярно заслушивает научные доклады сотрудников Центра и приглашенных ученых, доклад обычно сопровождается дискуссией.

Из фундаментальных основ GLP

Хорошая организация – это

- Обеспечение квалифицированному персоналу адекватных условий труда.
- Планирование исследований и использование ресурсов.
- Определение обязанностей персонала и организация подготовки и переподготовки сотрудников.
- Организация ведения дневников экспериментальной работы и правильного хранения архивов.
- Организация процессов проверки результатов.
- Обеспечение принципов GLP.

За обеспечение правильной организации работы в НЦБМТ РАМН отвечают заведующие лабораториями. Они составляют планы научной работы, закупки необходимого оборудования и расходных материалов, кормов для животных, размещения персонала, лабораторных животных, материальных ресурсов в корпусах и лабораториях. Заведующие следят за соблюдением правил GLP, правильно ведением и хранением записей и архивов.

Отдел кадров НЦБМТ РАМН готовит должностные инструкции и планы подготовки и переподготовки персонала лабораторий.

Соблюдение принципов GLP в корпусах обеспечивается за счет проведения капитального и текущего ремонта, установки всего необходимого оборудования, четкого соблюдения границ внутри помещений. Животных, участвующих в экспериментальных исследованиях, необходимо содержать в приспособленных для этого помещениях, клетках соответствующих типов, с соблюдением правильного освещения, температуры, влажности, вентиляции, плотности содержания и половозрастных групп животных, допустимого уровня шума и т. д. Необходимо уделять особое внимание достаточности количества людей, обслуживающих животных, инструктаж по правильному обращению с ними. Квалифицированный персонал Центра обеспечивает соблюдение биоэтических правил трех R, подбирает возможные альтернативные модели для получения качественных результатов исследований. Кроме соблюдения правил гуманного обращения с животными, необходимо соблюдать и правила личной безопасности.

Из фундаментальных основ GLP

Персонал и менеджмент

Ключевые моменты системы управления можно описать как:

- Планирование использования ресурсов.
- Управление кадрами посредством документации.
- Подготовка персонала.

До приема на работу проводится собеседование, во время которого выявляются возможности каждого конкретного сотрудника для работы с лабораторными животными и участия в экспериментальной работе. Кроме того, проводится медицинское обследование сотрудников, включая тесты на аллергические реакции. Кандидаты проходят микробиологическое исследование на наличие и носительство патогенных микроорганизмов опасных для животных, их заражения. Весь персонал,

работающий с животными, проходит обучение на случай возникновения ситуаций, угрожающих жизни и здоровью. В случае возникновения подобных ситуаций, действия персонала регламентируются инструкцией, утвержденной директором Центра и находящейся в каждом подразделении. Также в каждом подразделении имеется и своевременно пополняется аптечка для оказания неотложной помощи. Персонал, работающий с животными, постоянно обеспечивается требуемым количеством спецодежды, дезинфицирующих средств, мыла и крема для ухода за кожей рук.

Из фундаментальных основ GLP

Планирование (основное расписание)

Надо быть уверенным, что имеется достаточное количество сотрудников для выполнения исследований и поддержки работ.

Планирование использования ресурсов в соответствии с GLP называется основным расписанием или планом. Системы могут иметь множество форм, но каждая система должна быть основана на том, что:

- все исследования (по договорам и свои собственные) включены в нее;
- имеется постоянный контроль времени выполнения работ;
- продолжительные работы (такие как составление протоколов и отчетов) имеют запас времени;
- система является «официальной» (т.е. нет другой возможности достичь цели);
- система описана в терминах системы стандартных процедур (Standard Operating Procedures – SOP);
- определены основные пункты исследований и возможности их корректировки;
- различные версии основного расписания составлены и убраны в архив в качестве черновых материалов;
- распределение обязанностей соответствует плану исследований с определением ответственных исполнителей.

В большинстве лабораторий система включает все эти элементы. После подписания протокола и начала работ по проекту все выполняется в соответствии с основным расписанием. Это является функцией управления проектом и компьютеризировано для повышения эффективности и упрощения контроля за пересекающимися работами. Основное расписание описывается в терминах SOP. Раздел «Поддержка качества» в файле данных, как правило, имеет статус «Только для чтения» («Read-only») и «Печать» («Print»). А поля с именами спонсора и названием продукта обычно закодированы для обеспечения конфиденциальности. Проверка плана поддержки качества будут описаны отдельно.

Основная часть научно-исследовательской работы НЦБМТ РАМН планируется заранее и выполняется в соответствии с планом НИР, утвержденным Бюро ОМБН РАМН. Однако в течение года происходят изменения, которые требуют корректировки основных планов и перераспределения ресурсов. Поэтому «синдрома понедельника» избежать удастся далеко не всегда. Постоянный контроль за выполнением исследований со стороны администрации позволяет несколько сгладить такие моменты, но полностью исключить их пока не удается.

Из фундаментальных основ GLP

Организация персонала

Менеджмент необходим для всех сфер организации. Относительно персонала он обычно отражается в организационных вопросах. В качестве нормативных документов используются таблицы учета рабочего времени и нормы обслуживания, утвержденные вышестоящими организациями.

К требованиям GLP по персоналу относятся компетентность (образование, опыт работы, подготовка и переподготовка) в области выполнения своих функциональных обязан-

ностей. Компетентность персонала отражается в должностных обязанностях, автобиографии (Curricula Vitae – CV) и документах о прохождении курсов подготовки и переподготовки. Эти документы должны быть описаны в SOP, регулярно обновляться и проверяться в процессе аудита поддержки качества.

Персонал НЦБМТ РАМН представляет собой весьма квалифицированных сотрудников, имеющих все необходимые навыки обращения с животными и проведения экспериментальных исследований. Обслуживающий персонал имеет большой опыт практической работы. Большинство научных сотрудников имеют ученые степени и опыт работы с животными. Любая экспериментальная работа Центра имеет руководителя, который следит за правильностью выполнения плана эксперимента и качеством работы. Отдел кадров НЦБМТ РАМН следит за выполнением должностных обязанностей каждым сотрудником, отслеживает прохождение курсов повышения квалификации, подготовки и переподготовки специалистов различных уровней.

Из фундаментальных основ GLP

Определение задач и ответственности

Любая качественная система опирается на ответственность людей за их действия. Это может быть описано двумя следующими положениями.

- Не делай ничего, пока не поймешь содержание работы, последовательности выполнения операций и зачем это необходимо.
- Каждый исполнитель подписывает свою работу и чувствует полную ответственность за ее корректное выполнение.

Для каждой работы должны быть даны четкие определения задач и ответственности за их выполнение.

Содержание работ должно быть описано и соотнесено с квалификацией работника, ука-

занной в автобиографии (CV). Дополнительно они должны:

- уточняться в минимально короткие интервалы времени (зафиксированные в SOP);
- подписываться уполномоченным лицом или, по крайней мере, соответствующим участником от аппарата управления.

Права делегирования полномочий определяются удобством контроля. Задачи могут быть делегированы, но окончательный вариант подписывает лицо, которое ставило задачу.

Ежегодный отчет с описанием всех работ или какими-либо реорганизационными мероприятиями поможет в установлении того, что вся работа в целом взаимосвязана.

В НЦБМТ РАМН руководитель исследования не только определяет цели и задачи эксперимента в целом, но конкретизирует их выполнение по каждому этапу работ и каждому исполнителю, следит за правильностью выполнения всех инструкций. До начала экспериментальной работы руководитель проверяет наличие СОПов, при необходимости разрабатывает новые СОПы, которые хранятся в специально отведенном для этого помещении и в любой момент доступны для исполнителей. Исполнители ведут дневники наблюдений на протяжении всего эксперимента, обрабатывают результаты исследований и сдают свои отчеты для сведения их в единое целое.

Из фундаментальных основ GLP

Автобиография (Curriculum Vitae – CV)

Процедура заключается в установлении того, что:

- Все характеристики имеют стандартную форму.
- Подготовлены в срок.
- Переведены на английский язык (те, которые необходимы для передачи).
- Имеются в архивах со всеми доработками.

Каждый сотрудник должен иметь свою характеристику. Даже если у сотрудника нет достаточной квалификации, он должен иметь опыт практической работы, который отражается в характеристике. Обычно в характеристике отражают следующие вопросы.

- Имя, возраст, пол.
- Образование, включая дипломы и квалификации, полученную в процессе работы.
- Опыт профессиональной работы в институте и до того.
- Список публикаций.
- Участие в ассоциациях.
- Знание языков.

Отдел кадров НЦБМТ РАМН ведет личные дела каждого из сотрудников с отражением перечисленных выше вопросов. Личное дело начинает формироваться при приеме на работу и постоянно обновляется в соответствии с изменениями, происходящими в процессе работы.

Из фундаментальных основ GLP

Подготовка и переподготовка

Окончательно записи о подготовке и переподготовке вносятся в автобиографию (CV) и описание занимаемых должностей: компетентность работника требует специализации, которую можно получить внутри и вне организации, в которой работает сотрудник. Требования GLP в этой области заключаются в

том, что все сотрудники должны понимать, что такое GLP, ее важность, руководствоваться в своей работе требованиями GLP. Подготовка и переподготовка должна быть запланирована и задокументирована. Система подготовки базируется на процедурах SOP. Новые SOP требуют новой сертификации сотрудников, выполняющих соответствующие операции. Некоторые компании имеют схемы подготовки и переподготовки сотрудников с последующей мотивацией, продвижением по службе и поощрением. Система подготовки и переподготовки персонала имеет те же общие для всей системы GLP черты: документальное подтверждение, поддержка, стандартный формат документа, описание в SOP и сохранение всех записей в архивах.

Подготовка и переподготовка персонала проводится как на базе Центра, особенно для филиалов, а также на базе высших учебных заведений и научных учреждений, с которыми поддерживаются тесные профессиональные связи. Получение дополнительной квалификации сотрудниками поощряется материально.

Список литературы

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

Good laboratory practice (GLP): personnel and management in experimental studies in Scientific Center of biomedical technologies under the RAMS

A.O. Revyakin, E.L. Matveenko, G.D. Kapanadze

Management and personnel requirements of GLP in experimental studies are described for conditions of Scientific Center of Biomedical Technologies RAMS.

Key words: good laboratory practice (GLP), personnel, management, experimental studies.



Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов

А.Ю. Зурабов¹, Н.Н. Каркищенко², Д.В. Попов¹, Е.Л. Жиленков¹,
В.М. Попова¹

¹ – Научно-производственный Центр «МикроМир», Москва

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Виктор Григорьевич Попов popoviie@mail.ru

В статье проанализированы основные принципы конструирования лечебно-профилактических фаговых препаратов и создания коллекции бактериофагов в научно-производственном центре «МикроМир».

Ключевые слова: фаготерапия, бактериофаги, бактериальные инфекции.

В течение десятилетий наша страна занимала лидирующие позиции в мире в области бактериофагии – одной из перспективных областей биологической науки. Благодаря исследованиям систем «фаг-клетка» были сформулированы базовые принципы, на которых основаны многие направления современной молекулярной биологии. Изучение свойств фагов в течение нескольких последних десятилетий способствовало развитию концепции фаготерапии. Последние двадцать лет социально-экономические изменения в нашем обществе привели к сокращению финансирования многих научных направлений, а порой — к забвению тех перспективных разработок, которые были созданы советской научной школой. Это относится и к вопро-

сам бактериофагии. Отсутствие средств привело к частичной утрате как рабочих коллекций бактериофагов, созданных ведущими российскими специалистами за долгие годы работы, так и к остановке перспективных поисковых работ.

В настоящее время в мире тема бактериофагии получает все возрастающее внимание и интерес. От внутрибольничных инфекций в мире погибает свыше 100 тыс. человек ежегодно. Большое количество хронических больных приобретает резистентность ко всем известным антибиотикам. Антибиотики далеко не всегда эффективны при лечении болезней бактериальной этиологии. Выделяемые из клинических материалов патогены, как правило, устойчивы к целому ряду антибиотиков. Многие клиницисты

в целом ряде случаев считают целесообразным дополнить антибиотикотерапию фаготерапией, основанной на использовании вирулентных узкоспецифичных бактериальных вирусов.

Все актуальнее становится вопрос применения бактериофагов в сельском хозяйстве (животноводство, растениеводство, рыбное хозяйство и др.), в сохранении пищевых продуктов без применения химических соединений.

Бактериальные вирусы в сравнении со всеми другими известными антибактериальными препаратами имеют следующие преимущества:

- фаги не подавляют рост представителей нормофлоры человека и животного;
- фаги лизируют антибиотикоустойчивые патогенные микроорганизмы;
- концентрация фагов в инфекционном очаге нарастает за счет их репродукции и быстро снижается после ликвидации инфекции;
- фаги не оказывают отрицательного влияния на эукариотические клетки;
- фаги могут быть использованы для профилактики бактериальных болезней.

Взаимодействие фага с бактерией можно условно разделить на несколько этапов. Первоначально фаг адсорбируется на определенных рецепторных участках клеточной поверхности. Затем происходит проникновение фаговой нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в клетку. С этого момента функционирование всего биосинтетического аппарата микроорганизма изменяется. Далее в процессе самосборки формируются дочерние фаги, то есть частицы размером 50-100 нм. Специфические фаговые ферменты разрушают клеточную стенку, освобождающиеся бактериальные вирусы взаимодействуют с другими клетками. Таким образом, фаги репродуцируются в

геометрической прогрессии, пока не будет уничтожена основная часть популяции конкретного микроба [6].

Для сохранения и дальнейшего развития национальной школы прикладной бактериофагии в 2010 г. создан Научно-производственный центр «МикроМир» под патронажем А.Ю. Зурабова.

На первом этапе главной задачей НПЦ «МикроМир» являлось объединение в Центре специалистов с большим опытом работы в фундаментальной и прикладной сферах вирусологии и создание для них необходимых условий для кропотливого и длительного воссоздания прежних лидирующих позиций российской школы бактериофагии.

Одно из основных направлений деятельности Центра на перспективу – формирование коллекции бактериальных вирусов. Всестороннее изучение характеристик бактериофагов осуществляется в Центре на базе лабораторий, оснащенных необходимым оборудованием (электронный микроскоп, скоростные центрифуги, качалки, флюориметры, мультискан и другие приборы) с применением современных вирусологических методов. Эксперименты по изучению биологических свойств фагов проводятся в соответствии с рекомендациями Международного Комитета по Таксономии Вирусов [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

На сегодняшний день коллекция фагов НПЦ «МикроМир» имеет международный статус и зарегистрирована в международной организации WFCC (World Federation for Culture Collections), рег. № 986. На сегодня НПЦ «МикроМир» располагает коллекцией бактериальных вирусов с литической активностью по отношению к микроорганизмам родов *Listeria*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Yersinia*, *Burkholderia*, *Staphylococcus*,

Streptococcus, *Haemophilus* и др. (25 родов). В коллекцию включены уникальные фаги, лизирующие возбудителей туберкулеза. Научным консультантом фаговых проектов является д.б.н. Э.Р. Зурабова. Группа вирусологов под руководством В.М. Поповой и Е.Л. Жиленкова пополняет коллекцию фагов новыми формами, изолированными из различных природных источников. Вирусологи выделяют фаги на основе методик собственной разработки. Методы изолирования необходимых фагов из природных материалов разрабатывались в течение трех десятилетий и являются предметом know how [3, 4, 5].

Деятельность НПЦ «МикроМир» имеет выраженную прикладную составляющую. Многолетний опыт ведущих специалистов Центра, подробное исследование свойств выделенных фагов позволяет оценить перспективы их практического применения. Конструирование образцов проводится с ориентацией на определенные критерии:

1. Препарат должен включать строго вирулентные бактериальные вирусы с широким литическим спектром по отношению к штаммам конкретного патогена.
2. Фаги лечебно-профилактического препарата не должны взаимодействовать с представителями нормофлоры.
3. Фаги должны воспроизводиться в клетке-хозяине с высоким выходом (урожайностью) активных частиц.
4. Отобранные фаги должны сохранять литическую активность при длительном хранении лизатов.
5. Фаговый препарат должен содержать несколько видов бактериальных вирусов, существенно отличающихся друг от друга по специфике взаимодействия с чувствительной клеткой. Применение таких комбинаций разных бактериаль-

ных вирусов при лечении и профилактике значительно уменьшает вероятность генерации фагорезистентных форм в популяции патогена [1].

Таким образом, лечебный препарат должен представлять собой комбинацию (сочетание) различных бактериальных вирусов, отобранных по определенным критериям. Правильность изложенного выше методологического подхода неоднократно подтверждена вирусологами НПЦ «МикроМир» при конструировании конкретных лечебно-профилактических фаговых препаратов.

Один из примеров успешных разработок – фаговый препарат для профилактики и лечения гингивита и парадонтита («Фагодент»). На начальном этапе работы исследовали этиологическую структуру стоматологических заболеваний. Показано, что микробный пейзаж клинических материалов (соскобы со слизистых десен, отделяемое пародонтальных карманов пациентов и т.д.) представлен патогенами *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides gracilis*, *Wolinella recta*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus* и *Campylobacter rectus*.

Второй этап работы – поиск бактериофагов с литической активностью по отношению к перечисленным патогенам. На наличие бактериальных вирусов было изучено около тысячи образцов из различных природных источников (клинические материалы, стоки, почвы и т.д.). Широкие поисковые исследования позволили выделить около 100 видов фагов. Дальнейшее детальное изучение их характеристик позволило отобрать наиболее перспективные формы. В итоге был сконструирован лечебно-профилакти-

ческий препарат, включающий более 30 видов фагов (по 3-4 вида для каждого патогена) [2].

Среди аналогичных разработок НПЦ «МикроМир» следует отметить экспериментальные препараты для лечения и профилактики:

- 1) хирургических инфекций – абсцессов, фурункулов, флегмон и др. («Пиофагин»);
- 2) урогенитальных инфекций – уретритов, циститов, пиелонефритов и др. («Урофаг»);
- 3) инфекций желудочно – кишечного тракта («Кишечный бактериофаг»);
- 4) воспалительных заболеваний кожи («Фагодерм»);
- 5) ЛОР-патологии бактериальной этиологии («Фаголор»);
- 6) инфекционных заболеваний половых органов («Фагогин»).

На данном этапе НПЦ «МикроМир» разрабатывает новые фаговые препараты для профилактики и лечения заболеваний, вызываемых патогенами родов *Yersinia*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Listeria*, *Aeromonas* и др. Препараты будут применяться в медицине и ветеринарии. Ведется разработка профилактических средств для обработки помещений и пищевых продуктов. Ведутся работы по созданию биологически активных добавок с бактериофагами для профилактики желудочно-кишечных инфекций человека и животных, фаговых препаратов для борьбы с бактериозами растений и ферментных препаратов (лизинов).

В планах НПЦ «МикроМир» предусмотрено пополнение коллекции бактериальных вирусов, строительство нового корпуса Центра с соблюдением всех требований GMP, создание системы обучения молодых специалистов.

Список литературы

1. **Попов Д.В.** Разработка фагового препарата для лечения хронического гнойного среднего отита. Автореф. дисс. н. с. уч. степ. канд. мед. наук. Москва. 2003. 29 с.
2. **Жиленков Е.Л., Попов Д.В., Желудева И.В., Чубатова С.А., Попова В.М., Бальянская Э.Л., Казначеева Л.Ф.** Изучение возможности использования фаготерапии для антимикробной терапии гнойно-воспалительных инфекций в дерматологии, стоматологии, отоларингологии. Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», М. 2001. Сборник тезисов докладов. 371 с.
3. **Жиленков Е.Л., Попов Д.В., Попова В.М., Дарбеева О.С., Майская Л.М.** Совершенствование методов конструирования бактериофагов для лечения лор-патологии // Биопрепараты. 2002. № 2-6. С. 2-6.
4. **Попова В.М., Жиленков Е.Л., Попов Д.В.** Выделение новых стафилококковых фагов и получение эффективного лечебного препарата бактериофага против стафилококковой инфекции. Конференция «Проблемы медицинской и экологической биотехнологии». Оболенск. 14-15 декабря 1999 г. Сборник тезисов докладов. С. 128-129.
5. **Попов Д.В., Попова В.М., Тульский В.С., Жиленков Е.Л.** Разработка комбинированного препарата бактериофагов для лечения инфекционных заболеваний уха, горла и носа. Сессия Российской Академии медицинских наук, посвященная памяти академика РАМН и РАМТН И.Н. Блохиной «Новые биотехнологии — практическому здравоохранению»

- нию». М. 2001. Сборник тезисов докладов. С. 62-63.
6. **Адамс М.** Бактериофаги. - М.: Изд-во Иностранной литературы, 1961. 527 p.
 7. **Ackermann H. – W.** Die classification des bacteriophages des cocci Gram – positives: Micrococcus, Staphylococcus et Streptococcus // Pathol. Biol. 1975. v. 23. 247 p.
 8. **Ackermann H. – W.** Die classification des phages caudes des enterobacteries // Pathol. Biol. 1976. v. 24. 359 p.
 9. **Ackermann H. – W., Cantor E. D., Jarvis A. W., Lembke J., Mayo J. A.** New species definitions in phages of Gram-positive cocci // Intervirology, 1984. v. 22. 181 p.
 10. **Ackermann H. – W., Dubow M. S.** Viruses of prokaryotes, vol. I. General properties of bacteriophages. – CRC Press: Boca Raton, 1987. 231 p.
 11. **Ackermann H. – W., Dubow M. S.** Viruses of prokaryotes, vol. II. Natural groups of bacteriophages. – CRC Press: - Boca Raton. 1987. 242 p.
 12. **Ackermann H. – W., Eisenstark A.** The present state of phage taxonomy // Intervirology. 1974. v. 3. P. 201-219.

Creation of native bacteriophages collection and principle of treatment and profilactic phages drug design

A.Yu. Zurabov, N.N. Karkischenko, D.V. Popov,
E.L. Zhilenkov, V.M. Popova

The paper analyzes the basic principles of designing treatment and prevention of phage preparations and creating a collection of bacteriophages in the S-PC «MicroWorld»

Key words: phagetherapy, bacteriophages, bacterial infections.

Токсикологический профиль новых противовирусных производных аденина

Д.Г. Ковалев¹, Н.А. Мохаммад Амин²

¹ – НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград

² – Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Контактная информация: Ковалев Дмитрий Геннадьевич kovalev_dmi@mail.ru

Целью данной работы явилось изучение фармакологических свойств, определение широты диапазона безопасного действия и токсикологических свойств нового оригинального производного аденина, 9-[2-(4-изопропилфенокс)этил]аденин, под лабораторным шифром VMA-99-82, проявляющего противовирусную активность *in vitro*. В работе представлены результаты изучения нейротоксикологического профиля соединения VMA-99-82, с использованием методики многотестового наблюдения по «S.Irvin». В ходе исследования установлено, что по токсичности и по степени безопасности вещество VMA-99-82 относится к классу малотоксичных соединений. Определен диапазон доз (от 18,7 до 300 мг/кг) отчетливой терапевтической активности вещества, в которой сопутствующие побочные эффекты выражены несущественно.

Ключевые слова: производные аденина, токсикологический профиль, тест «S.Irvin», крысы.

В НИИ фармакологии Волгоградского государственного университета был открыт новый класс антицитомегаловирусных агентов, демонстрирующих активность *in vitro* в наномолярном диапазоне [1].

В рамках изучения фармакологических свойств и определения широты диапазона безопасного действия новых веществ были исследованы токсикологические свойства 9-[2-(4-изопропилфенокс)этил]аденин, под лабораторным шифром VMA-99-82, как типичного представителя этого класса химических соединений.

В настоящей работе представлены результаты изучения токсикологического профиля соединения VMA-99-82 с использованием схемы многотестового наблюдения по «S.Irvin».

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 90 белых лабораторных крысах обоего пола, мас-

сой 220-240 г. Проведение всех экспериментов над животными руководствуется базисными нормативными Рекомендациями Комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздравсоцразвития России, «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985)», а также согласно ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ 3 5100.4-96, правилами GLP. Приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики РФ», а также с разрешения Регионального независимого этического комитета ГУ Волгоградский Научный Центр РАМН и АВО. Вещество VMA-99-82, на 50% водном растворе ДМСО, вводили крысам внутрижелудочно (металлическим зондом) в арифметически возрастающих дозах от 18,7 до 4800 мг/кг за 1 ч до тестирования.

Таблица

Влияние вещества VMA-99-82 на функционально-поведенческий статус крыс

Параметры	Дозы вещества, мг/кг									
	Н.Ш.	18,7	37,5	75,0	150	300	600	1200	2400	4800
Поведенческие реакции										
Вокализация	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Настороженность	4	4	4	4	5	5	4	3	3	3
Пассивность	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Стереотипия	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Беспокойство	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Агрессия	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Грумминг	4	4	4	4,5	4,5	4,5	4	4	3	2
Спонтанная двигательная активность	4	4	4	5	5	5	4,5	3	3	2
Нервно-мышечная возбудимость										
Реакция на прикосновение	4	4	4,5	4,5	4,5	5	4,5	4,5	3	2
Реакция на боль	4	4	4,5	5	4,5	5	4,5	4,5	4	3
Реакция на стук	4	4	4	4,5	4	4	4	4	3	3
Тремор	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Подергивание	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Судороги	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Расстройство походки	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Тонус конечностей	4	4	4	4,2	4,5	4,5	4,5	4	3	3
Вегетативные эффекты										
Положение мигательной перепонки	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3
Размер зрачка	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2
Саливация	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5
Уринация	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2
Дефекация	4	4	4	3	3	3	2	2	2	4
Температура	4	4,5	4,5	5	5,5	6	5	3	3	3
Цвет кожи	4	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4	3	3	3
Частота дыхания	4	4,5	5	5,5	5,5	6	3,5	3,5	3	1

Исследование нейротоксикологического профиля соединения VMA-99-82 проводилось по методу «S.Irvin» [2].

Спектр внешне наблюдаемых изменений, вызванных исследуемым веществом, выражали количественно по восьмибальной шкале [3].

Кроме этого, в тесте «открытое поле» [4] у животных через 60 мин. после введения препарата исследовалась двигательная, поисково-исследовательская и эмоциональная активность.

Кроме того, с учетом данных ЛД₅₀ у тестируемого вещества вычисляли диапазоны терапевтической активности, прогнозировали доклиническую степень безопасности.

Каждые сутки в течение двух недель отмечали количество погибших и выживших животных. Расчет ЛД₅₀ производился по методу Личфилда-Вилкоксона (версия 1.03;18.10.93).

Результаты и их обсуждение

По результатам экспериментов был выявлен профиль психоневрологического действия VMA-99-82 в диапазоне доз от 18,7 до 4800 мг/кг. В обобщенном виде данные отражены в таблице.

Установлено, что в дозе 18,7 мг/кг вещество VMA-99-82 не влияет на поведение и нервно-мышечную возбудимость крыс. У данных животных лишь несколько активизируется частота дыханий и повышается ректальная температура (в среднем на 0,5°C). После введения крысам VMA-99-82 в дозах 37,5 мг/кг в поведении животных существенных изменений не зафиксировано. Температура тела крыс повышалась также идентично группе, находящейся под влиянием VMA-99-82 в дозе 18,7 мг/кг. Более существенными оказались эффекты испытуемого вещества, после введения в

дозах от 75 до 300 мг/кг. В указанном интервале под действием VMA-99-82 у крыс дозозависимо повышались настороженность, грумминг, спонтанная двигательная активность, также снижались пороги болевой и тактильной чувствительности, повышался тонус конечностей. Со стороны вегетативных эффектов у крыс под действием вещества VMA-99-82 наблюдалось усиление дыхательной активности, прогрессирующее повышение ректальной температуры. У животных под действием вещества в дозе 300 мг/кг ректальная температура повышалась в среднем на 2-2,5°C, а частота дыханий возросла в 2 раза. Кожные покровы крыс были гиперемированы. В диапазоне доз от 600 до 4800 мг/кг у животных дозозависимо угнетались поведенческие реакции, нервно-мышечная возбудимость. В частности, снижались до нормы, а затем и ниже нормы акты грумминга и горизонтальные формы передвижения. Повышались пороги болевой и тактильной чувствительности, понижалась ректальная температура (в среднем на 1,5-2°C), угнеталось дыхание. У крыс под действием вещества в дозе 4800 мг/кг дыхание было единичным и не равномерным (до 5-10 актов в мин.).

Суммируя полученные данные, можно заключить, что фармакологическая активность вещества VMA-99-82, прослеживаемая в диапазоне доз от 18,7 до 600 мг/кг, постепенно нивелируется при введении его в более высоких дозах. Эффекты VMA-99-82 после введения крысам в дозах от 1200 до 4800 мг/кг свидетельствуют о его токсическом влиянии.

Выводы

1. По уровню токсичности и по степени безопасности вещество VMA-99-82 относится к классу малотоксичных со-

единений. ЛД₅₀ составила 4000 мг/кг.

2. Активность вещества VMA-99-82 в диапазоне доз от 18,7 до 300 мг/кг, свидетельствует об отчетливой терапевтической активности вещества, в которой сопутствующие побочные эффекты выражены несущественно.

3. Терапевтическая активность соединения VMA-99-82 находится, в основном, в области поведенческих реакций, что представляет интерес для дальнейшего углубленного изучения психотропной активности и механизма действия вещества.

Список литературы

1. **Петров В.И., Озеров А.А., Новиков М.С. и др.** Новый класс ненуклеозидных ингибиторов вирусной репродукции – производные

9-[2-фенокси(бензилокси)этил]аденина // Бюлл. ВНИЦ РАМН и АВО. 2006. Вып. 1. С. 15-16.

2. **Иёжица И.Н., Спасов А.А., Бугаева Л.И., Морозов И.С.** Токсическое влияние бромантана на неврологический статус животных при однократном введении // Бюлл. Экспер. биологии и медицины. 2002. Т. 133. № 4. С. 38-44.
3. **Бугаева Л.И.** Токсикологическая характеристика новых психотропных препаратов класса актопротекторов и ноотропов: Автореферат. дис. докт. биол. наук / Л.И. Бугаева. Волгоград. 2001. 36 с.
4. **Буреш Я.** Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон. М.: Высшая школа. 1991. 399 с.

Neurotoxic profile of the new adenine derivative with antiviral activity

D.G. Kovalev, N.A. Mohammad Amin

The aim of the research was to study pharmacological properties, to determine safety effect diapason toxicological properties of new adenine derivative 9-[2-(4-isopropylphenoxypxy)ethyl] adenine under laboratory code VMA-99-82 which reveals antiviral activity *in vitro*. The results of the research of neurotoxic profile of the combination VMA-99-82 are presented in the work; methodics of multitest watching according to «S.Irvin» being used. In the course of the research it was determined safety level the substance VMA-99-82 refers to the class of low toxic combination. The diapason of doses (from 18.7 to 300 mg/kg) of the substance evident therapeutical effect in which accompanying side-effect are not essentially revealed was determined. Therapeutical effect of the combination VMA-99-82 is mostly in the field of behavioral reactions, which presents interest for further deep study of psychotropic effect the substance effect mechanism.

Key words: adenine derivatives, toxicological profile, «S.Irvin» test, rats.

Влияние препарата ионизированного серебра на репаративную регенерацию кожи и подлежащих тканей при моделировании термических и химических ожогов у крыс

Н.С. Пономарь¹, Ю.С. Макляков¹, Д.П. Хлопонин¹, А.О. Ревякин²

¹ – Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Пономарь Наталья Сергеевна natasha_a4@mail.ru

По предварительным данным, полученным на моделях термических и химических ожогов у крыс, анализируемый препарат ионизированного серебра обладает регенераторно-репаративной активностью в отношении кожи и подлежащих тканей. Об этом свидетельствуют результаты анализа сроков заживления термических и химических ожогов у крыс, согласно которым по своей ранозаживляющей активности изучаемый препарат сопоставим и даже несколько превосходит метилурацил.

Ключевые слова: регенерация, ожоги, серебро.

По данным ВОЗ, в структуре смертности населения планеты третье место занимают травмы, ожоги, отравления и прочие увечья. Из них на ожоговую травму приходится порядка 14%, и каждый год от нее страдает около 840 миллионов человек [13]. В России ежегодно регистрируется более 600 тыс. случаев ожоговой травмы, при этом у 60-80% обожженных имеются поверхностные и пограничные ожоги II-III степени, не требующие оперативного вмешательства [11, 12]. Среди методов, используемых в клинике для лечения подобных ожоговых ран, важное место занимает медикаментозная терапия, и, в первую очередь, применение лекарственных средств, способствующих заживлению ран [3, 8, 10].

На сегодня в арсенале врачей имеется большой выбор препаратов, обладающих свойствами регенерантов и репаратантов [2, 6], однако ни одно из них не является универсальным, а их эффект далек от

оптимального. Это обуславливает необходимость поиска и разработки новых лекарственных средств – стимуляторов регенераторных и репаративных процессов [1, 3].

В этом плане большой интерес могут представлять, в частности, препараты на основе серебра, целебные свойства которого по отношению к раневому процессу известны с давних пор. За 2500 лет до н.э. египетские воины использовали серебро для лечения боевых ран – накладывали на них тонкие серебряные пластины, и раны быстро заживали. Документальные записи о лечебном эффекте серебра оставлены «отцом медицины» Гиппократом, который еще в IV веке до н.э. упоминал, что серебро способствует быстрому излечению ран и помогает при других заболеваниях [7].

Наличие у серебра антимикробной и противовоспалительной активности известно уже давно. Недаром одно время, в том числе и у нас в стране, широко

применялись такие препараты серебра, как серебра нитрат (ляпис), протаргол и колларгол, в частности, это касалось и поражений кожи, включая различного рода язвы и экземы. И лишь с наступлением эры антибиотиков о серебре стали забывать и фактически забыли. Правда, в последние годы интерес к серебру начал возрождаться, и даже появился ряд новых препаратов, содержащих серебро в комплексе с сульфаниламидами (аргосульфам, дермазин) и нашедших применение при фармакотерапии ожогов, отморожений, пролежней, трофических язв.

Несколько лет назад Ростовским НИИ «Градиент» при участии кафедры фармакологии и клинической фармакологии РостГМУ был разработан новый лекарственный препарат ионизированного серебра (ПС), вошедший в Государственный реестр новых лекарственных средств в качестве дезинфектанта (для обеззараживания воды). Экспериментами по анализу его острой и хронической токсичности было установлено, что ПС может быть отнесен к категории малотоксичных и безопасных, также было продемонстрировано наличие у него противовоспалительной, антибактериальной и противогрибковой активности.

На основании вышеизложенного, мы посчитали целесообразным исследовать возможное ранозаживляющее действие этого ПС, исследовав его влияние на регенераторный потенциал поврежденной кожи и подлежащих тканей.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 60 конвенциональных рандомбредных крысах обоего пола массой 170-200 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария (при естественном

освещении, t воздуха $+20-22^{\circ}\text{C}$ и влажности 55-60%) в пластиковых клетках размером $55 \times 45 \times 15$ см, с подстилкой из древесных опилок, по 4-5 особей в клетке. Крысы потребляли гранулированный комбикорм (производитель ООО «Лабораторснаб») и воду *ad libitum* в поилках объемом 200 мл. В эксперимент животных забирали после 7 дней карантина.

Все крысы были разделены на 3 группы: контрольную, которым после моделирования ожога (термического или химического) рану ежедневно 3-кратно в сутки обрабатывали 0,9% раствором NaCl; опытную, у которых раны в аналогичном контроле режиме обрабатывали анализируемым раствором ПС и группу сравнения, у которой для обработки раны использовался метилурацил.

Моделирование термического ожога [4, 9]

За сутки до моделирования ожога на боковой поверхности тела крысы осуществляли депиляцию участков кожи (4×4 см) путем выбривания безопасной бритвой. Для удобства выбривания под кожу вводили 5-10 мл 0,9% раствора NaCl – кожа при этом растягивалась и повреждений при бритье не возникало.

При нанесении ожогов пустую стеклянную пробирку с внутренним диаметром 22 мм (площадь сечения 4 см^2) и длиной 20-25 см заполняли горячей водой, помещали ее вертикально в кипящую (100°C) воду на $2/3$ высоты, прогревали в течение 1 мин, через край заполняли на $2/3$ высоты и в вертикальном положении приводили в плотный контакт с оголенным участком кожи животного на 10 сек.

Образующиеся в результате ожога III степени имели округлую форму, дно ран было ярко-красным, местами с коричневым оттенком. Края представляли собой

слегка нависающие кусочки мягких тканей красно-коричневого цвета. Вокруг раны отмечалась зона гиперемии шириной 0,5-0,8 см, небольшое количество пузырей. На дне визуализировались межреберные мышцы, у ряда крыс местами были видны ребра.

Моделирование химического ожога [4]

За сутки до моделирования ожога осуществляли депиляцию кожи ранее описанным способом. На оголенное место наносили 2-3 капли концентрированной соляной кислоты и равномерно их распределяли.

Для формирующихся в результате ожогов III степени были характерны раны овальной или, реже, округлой формы с грязным на вид дном бурого-коричневого, местами красного, цвета. Края раны слегка нависали в виде мелких рваных кусочков красно-коричневого цвета. По периферии, вокруг краев раны, отмечалась зона гиперемии шириной порядка 1 см с небольшим количеством пузырей. У всех крыс в ране были видны скелетные (межреберные) мышцы, а у ряда животных визуализировались даже обнаженные ребра.

Моделирование обеих разновидностей ожогов осуществляли под эфирным наркозом, согласно требованиям Международного этического комитета по экспериментам на лабораторных животных [5].

На 2-е сутки эксперимента проводили вульвографию. Для этого на образовавшуюся ожоговую рану накладывали кальку, переносили контуры ран и вычисляли их площадь. Среднюю площадь ран оценивали на 5, 10 и 15-е сутки эксперимента.

Статистическую обработку полученных результатов исследований прово-

дили с использованием общепринятых методов параметрической (t -критерий Стьюдента) статистики при помощи пакета статистических программ Statistica 6.0 (Statsoft, USA).

Результаты и их обсуждение

Результаты, полученные по итогам моделирования термических и химических ожогов у крыс, в том числе с применением ПС, представлены в табл. 1, 2.

Так, на модели термических ожогов по сравнению с контрольной группой животных, у которых на 5 сутки эксперимента средняя площадь раны уменьшилась по сравнению с исходной всего на 16,1% (табл. 1), в группе ПС этот показатель составил 23%, что было также несколько больше, чем на фоне препарата сравнения метилурацила (19,1%). На 5-й день края ран у крыс группы ПС были неподвижны, спаяны с дном, завершалось покрытие их эпителиальной тканью. В группе контроля и на фоне метилурацила края раны также были покрыты эпителием, но местами их эпителизация была не завершена, а края ран с дном плотно спаяны не были.

На 10-е сутки, после снятия струпа с ожоговой поверхности, раны крыс, леченных ПС, имели чистое розовое дно и располагались на уровне краев кожи. Средняя площадь их уменьшилась почти на 52%, что было существенно больше, чем в контроле (23,4%), и выше, чем на фоне метилурацила (41,8%). Еще более убедительные результаты были получены к 15-м суткам эксперимента, составив 82,2%, 72% и 45% для групп, получавших ПС, метилурацил, и группы контроля, соответственно. Окончательное и полное заживление ожоговых ран у крыс, пролеченных ПС, наступало к 17-19-м суткам, в группе, леченных

Таблица 1

Заживление ран у крыс после термического ожога

№	Препарат	Средняя площадь раны, мм ²			
		Исходная	5-й день	10-й день	15-й день
1	Контроль	34,2±0,9	28,7±2,2	26,2±2,1	18,8±1,3
2	Метилурацил	33,7±0,8	24,5±2,1	17,8±1,7 ¹	9,5±0,9 ¹

Примечание: Данные в таблице представлены в виде М±m для всех групп животных;

¹ – достоверные отличия по отношению к группе контроля (p<0,05).

метилурацилом, – к 19-21-му дню, у контрольной группы – к 21-24-му дню.

На следующем этапе эксперимента производили анализ влияния испытуемого ПС на течение химического ожога. В этом случае общая картина в целом напоминала таковую при термическом ожоге.

На 5-е сутки терапии ПС средняя площадь ран уменьшалась на 37,2%, что было сравнимо с группой метилурацила (36,6%) и недостоверно превышало показатели группы контроля (26%) (табл. 2). К 10-м суткам в опытной группе (ПС) площадь ран снизилась почти на 63% (по сравнению с 58% в группе, леченной

метилурацилом), что уже от контроля (35,3%) отличалось существенно. Таким образом, в эти сроки эксперимента средняя площадь раны у крыс опытной группы, будучи сопоставимой с группой сравнения, была в 1,8 раза меньше, чем в контроле.

К 15-м суткам на фоне применения ПС средняя площадь раны уменьшалась уже на 87,8%, причем ее размеры были в 1,9 раза меньше, чем при использовании метилурацила и в 4 раза – по сравнению с контролем.

Уже к 16-17-м суткам у крыс, леченных раствором ПС, отмечалось полное,

без каких-либо рубцовых изменений, заживление ожоговых ран. Аналогичные изменения наблюдались и в группе животных, получавших метилурацил, но только к 18-20-му дню. В группе контроля полное заживление ран отмечено только на 21-23-е сутки.

Таким образом, судя по полученным результатам, можно вынести предварительный вердикт о наличии у исследуемого препарата ионизированного серебра свойств регенеранта и репаранта, которые, по меньшей мере сопоставимы, а при химических ожогах объективно превышают таковые у препарата сравнения метилурацила. Применение ПС сокращало сроки заживления ожоговых термических ран в среднем на 2 суток по сравнению с группой, леченной метилурацилом, и на 4 суток по сравнению с контрольной группой. Аналогичные показатели для химических ожогов составили 2 и 4,5 суток, соответственно.

Однако, для вынесения четкого и однозначного вердикта относительно наличия у испытуемого препарата свойств регенеранта и репаранта необходимы более масштабные и углубленные исследования, в том числе с применением биохимических и морфологических методов исследования.

Выводы

Исходя из результатов проведенного эксперимента, можно констатировать наличие у анализируемого препарата ионизированного серебра способности стимулировать репаративную регенерацию кожи и/или подлежащих тканей. Судя по показателям времени заживления ран после термических и химических ожогов, ПС по своей регенеративно-репаративной активности сопоставим и порой даже несколько превосходит метилурацил.

Список литературы

1. **Билич Г.Л., Колла Э.В.** Фармакологическая регуляция регенераторных процессов в клинике и эксперименте. Горький. 1978. С. 10-17.
2. **Герасимова Л.И., Назаренко Л.И.** Термические и радиационные поражения: Руководство для врачей. М.: 2005. 384 с.
3. **Динзмор Ч.Е.** Истоки современных исследований в области регенерации: история вопроса // Онтогенез. 1992. Т. 23. № 1. С. 5-22
4. **Исмаилова А.Ф., Белов А.Е., Зарудий Ф.С., Исмаилова Л.У., Кривоногов В.П., Халимов Р.Ф., Толстиков Г.А., Тропынина Ю.В.** Влияние некоторых производных пиримидина на репаративную регенерацию кожи лабораторных животных при стрессе // Эксп. и клин. фармакология. 2000. Т. 63. № 4. С. 68-69.
5. **Каркищенко Н.Н.** Лабораторные животные (положение и руководство). М.: Межакадемическое изд-во «ВПК». 2003. 138 с.
6. **Комбустиология / под ред. Э.Я. Фисталь, Г.П.Козинец.** Донецк. 2006. 236 с.
7. **Кульский Л.А.** Серебряная вода. Киев: Наукова думка. 1987. 136 с.
8. **Лазарев М.В., Лифшиц Р.И.** Стимуляторы регенерации и анаболизаторы // Клинич. хирургия. 1983. № 1. С. 15-19.
9. **Парамонов Б.А., Чеботарев В.Ю.** Методы моделирования термических ожогов кожи при разработке препаратов для местного лечения // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2002. Т. 134. № 11. С. 593-597.
10. **Раны и раневая инфекция: руководство для врачей / под ред. М.И. Кузина, Б.М. Костюченко.** М.: Медицина. 1993.

Таблица 2

Заживление ран у крыс после химического ожога

№	Препарат	Средняя площадь раны, мм ²			
		Исходная	5-й день	10-й день	15-й день
1	Контроль	39,1±3,1	28,9±2,0	25,3±1,6	18,8±1,3
2	Метилурацил	38,8±2,9	24,6±2,1	16,3±1,8 ¹	8,9±1,0 ¹
3	ПС	38,7±2,8	24,3±1,8	14,4±1,6 ¹	4,7±0,9 ¹²

Примечание: Данные в таблице представлены в виде М±m для всех групп животных;

¹ – достоверные отличия по отношению к группе контроля (p<0,05);

² – достоверные отличия по отношению к метилурацилу (p<0,05).

- 11. Спиридонова Т.Г.* Консервативное лечение ожоговых ран // Росс. мед. журн. 2003. – Т. 9. № 13-14. С. 560-563.
- 12. Спиридонова Т.Г.* Патогенетические аспекты лечения ожоговых ран // Росс. мед. журнал. 2002. Т. 10, № 8-9. С. 395-399.
- 13. Berns E.* Characteristic and current status of injuriment in the world // Dutch J. Biol. & Med. 2005. Vol. 3. P. 23-27.

Ionized silver medicinal preparation influence on reparative regeneration of the skin & underlying tissues in the model of thermal & chemical burns in rats

N.S. Ponomar, Yu.S. Maklyakov, D.P. Khloponin, A.O. Revyakin

According to preliminary results, obtained on the models of thermal & chemical burns in rats an analyzed ionized silver medicinal preparation possesses a regenerative & reparative activity in skin and/or underlied tissues. The parameters of wound healing time are indicative of such properties, which are comparable or even slightly exceed the same of methyluracil.

Key words: regeneration, burns, silver.