

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 (д.б.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.), Х. Х. Семёнов (к.б.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:

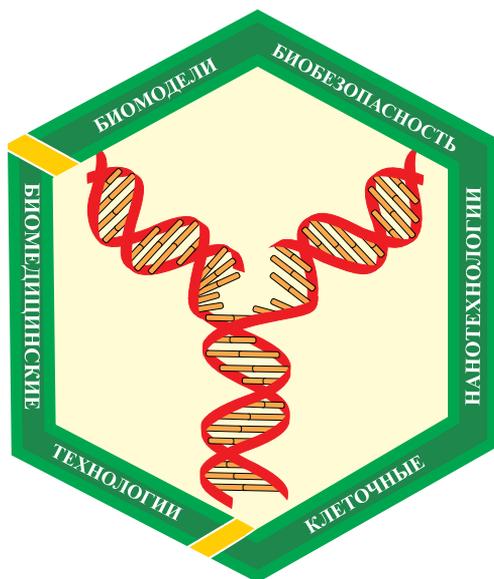
член-корр. РАН и РАМН К. В. Анохин, проф. Е. Е. Ачкасов, prof. Iorgen Backmen (Германия),
акад. РАМН и РАСХН В. А. Быков, проф. Витан Влахов (Болгария), акад. РАМН А. М. Дыгай,
prof. Moineao S.-F. D'Herelle (Канада), акад. РАМН С. И. Колесников, акад. РАМН А. А. Кубатиев,
акад. РАМН В. Г. Кукес, акад. 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 07.09.2012 г.
Тираж 3 000 экз.



Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Н.Н. Каркищенко, Д.Б. Чайванов Аппаратное обеспечение физических методов психотерапии.....	6
--	---

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

Н.Н. Каркищенко, Л.Ю. Завальский Оценка эффективности антибиотиков и бактериофагов альтернативными методами.....	15
--	----

А.А. Кулаков, В.А. Бадалян, Г.Д. Капаназе Планирование доклинических исследований на светлогорских мини-свиньях в имплантологии.....	18
--	----

Е.Н. Иомдина, О.А. Киселева, Л.А. Назаренко, Н.Ю. Игнатьева, В.Н. Баграташвили Влияние биомеханических свойств корнеосклеральной капсулы глаза на гидродинамику внутриглазной жидкости.....	25
---	----

О.В. Мосин, И. Игнатюк Изучение изотопных эффектов тяжелой воды (D ₂ O) в биологических системах на примере клеток прокариот и эукариот.....	35
---	----

Н.А. Щудло, Т.Н. Варсегова, Т.А. Ступина, И.В. Борисова Структурная реорганизация бедренной и большеберцовой артерий, малоберцового нерва и хряща коленного сустава при экспериментальных переломах костей голени у собак и их лечении методом чрескостного остеосинтеза.....	51
---	----

А.Л. Ясенявская, С.А. Лужнова Влияние эмоксипина на морфометрические показатели щитовидной железы белых крыс в постнатальном онтогенезе в условиях иммобилизационного стресса.....	63
--	----

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Н.В. Станкова, Г.Д. Капаназе Новые специализированные линии и семейства лабораторных мини-свиней.....	68
---	----

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко, Е.Л. Матвеев, Г.Д. Капаназе Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей Сообщение 1: Исследование последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на стадии раннего органогенеза на жизнеспособность эмбрионов у самок крыс и мышей.....	73
--	----

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

А.С. Сивков, С.К. Сивкова, В.Г. Кукес, Г.В. Раменская Фармакокинетика и клиническая эффективность гиполипидемического препарата Аторвастатина..	79
---	----

А.А. Чуринов, М.Г. Данилец, А.М. Дыгай Оценка токсичности <i>in vitro</i> нового перевязочного материала.....	85
---	----

И.Е. Шохин, Ю.И. Кулинич, Г.В. Раменская, В.Г. Кукес Применение биологической модели для оценки кишечной проницаемости <i>in vitro</i> – монослой эпителиальных клеток Caco-2.....	91
---	----

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

О.А. Махарин, Ю.С. Макляков, В.М. Женило Полиморфизм генов системы детоксикации ксенобиотиков и его роль в биотрансформации внутренних анестетиков.....	98
---	----

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ РАБОТА

В.Д. Макушин, М.А. Степанов, Т.А. Ступина Экспериментальное моделирование остеоартроза коленного сустава у собак.....	108
---	-----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

О.И. Степанова, О.В. Баранова, Х.Х. Семенов, Н.В. Касинская, Л.Х. Казакова, В.Н. Каркищенко Генетическая модель пародонтоза и коррекция основных признаков заболевания стволовыми и прогениторными клетками костного мозга.....	116
---	-----

Р.А. Калёкин Идентификация нейрорепродукторов – производных бензамина в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	121
---	-----

Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

N.N. Karkishchenko, D.B. Chayvanov
Hardware of physical methods of psychotherapy 6

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

N.N. Karkishchenko, L.Yu. Zavalsky
Assessment of antibiotics and bacteriophages by alternative methods..... 15

A.A. Kulakov, V.A. Badalyan, G.D. Kapanadze
Planning of preclinical researches in implantology on mini-pigs 18

E.N. Iomdina, O.A. Kiseleva, L.A. Nazarenko, N.Yu. Ignatieva, V.N. Bagratashvili
The impact of biomechanical properties of the corneoscleral shell on eye hydrodynamics (an experimental study)..... 25

O.V. Mosin, I. Ignatov
Studying of isotopic effects of heavy water (D₂O) in biological systems on example of prokaryotic and eukaryotic cells..... 35

N.A. Chtchoudlo, T.N. Varsegova, T.A. Stupina, I.V. Borisova
Structural reorganization of femoral and tibial arteries, peroneal nerve, and the knee cartilage for experimental canine leg bone fractures and their treatment by transosseous osteosynthesis technique 51

A.L. Yasenyavskaya, S.A. Lugnova
The influence of the emoxipine on morphometric index of the thyroid gland of the white rats in the postnatal ontogenesis under immobilization stress..... 63

LABORATORY ANIMALS

N.V. Stankova, G.D. Kapanadze
New specialized lines and families of laboratory mini-pigs 68

BIOMEDICAL METHODS

H.H. Semenov, N.N. Karkishchenko, E.L. Matveenko, G.D. Kapanadze
Influence of acute hypobaric hypoxia on reproductive function of laboratory rats and mice
Message 1: Research of consequences of influence of acute hypobaric hypoxia at a stage early organogenesis on viability of embryos at females of rats and mice..... 73

CLINICAL PHARMACOLOGY

A.S. Sivkov, S.K. Sivkova, V.G. Kukes, G.V. Ramenskaya
Pharmacokinetics and clinical efficacy of the lipid-lowering drug Atorvastatin 79

A.A. Churin, G.M. Danilets, A.M. Dygai
Assessment of toxicity in vitro of a new bandaging material 85

I.E. Shohin, J.I. Kulinich, G.V. Ramenskaya, V.G. Kukes
Application of biological model for an assessment of intestinal permeability of *in vitro* – a monolayer of epithelial cells Caco-2..... 91

PHARMACOGENETIC

O.A. Maharin, Y.S. Maklyakov, V.M. Genilo
Polymorphism genes of the system xenobiotics detoxication and its role in biotransformation of intravenous anaesthetics 98

EXPERIMENTAL WORK

V.D. Makushin, M.A. Stepanov, T.A. Stupina
Experimental modeling of the knee osteoarthritis in dogs 108

BRIEF REPORTS

O.I. Stepanova, O.V. Baranova, H.H. Semenov, N.V. Kasinskaya, L.Kh. Kazakova, V.N. Karkishchenko
Genetic model of periodontosis and correction of the main symptoms of a disease by stem and progenitor cells of a marrow 116

R.A. Kalyokin
Identification of neuroleptics – derivatives benzamide in blood a method of a highly effective liquid chromatography..... 121



Аппаратное обеспечение физических методов психотерапии

Н.Н. Каркищенко¹, Д.Б. Чайванов²

¹ – ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, Московская область

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Контактная информация: академик РАН, член-корр. РАМН

Каркищенко Николай Николаевич niknik2808@yandex.ru,

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

В статье рассмотрены технологии нейромодуляции и их применение в контексте психоанализа.

Ключевые слова: психотерапия, физиотерапия, нейротерапия, нейростимуляция.

Применяемые сегодня методы психотерапии можно условно разделить на фармакологические, физиотерапевтические, психотерапевтические и нейрохирургические методы. Физиотерапевтические методы имеют такие существенные преимущества как возможность пространственной и временной локализации, простота изменения под нужды конкретного пациента, минимальные побочные эффекты, возможность синхронизации с психофизиологическими процессами пациента. В настоящей работе описывается созданный в лаборатории нейростимуляции НИЦ «Курчатовский институт» транскраниальный полимодальный биоуправляемый нейромодулятор, сочетающий в себе все известные методы транскраниальной нейромодуляции с возможностью управления параметрами воздействия по физическим маркерам

психофункционального состояния. Также высказаны некоторые предложения по применению данного прибора в контексте психотерапии.

Для выявления места физических методов психотерапии рассмотрим их в сравнении с прочими методами.

Фармакологические методы оказывают направленное воздействие на биохимические процессы в головном мозге. Они заключаются в фармакологическом лечении, вызывающем длительные изменения биохимии мозга и, как следствие, коррекции когнитивных процессов. Следует подчеркнуть, что характерные времена изменения существенно больше характерных времен когнитивного акта. Можно сказать, что вследствие фармакологических воздействий меняется фон, на котором протекает когнитивный процесс. Наряду с невозможностью времен-

ной локализации воздействия затруднена и пространственная локализация. Такая локализация частично обеспечивается тем, что лекарственные препараты влияют преимущественно на один из биохимических процессов. Однако один и тот же биохимический процесс может обеспечивать различные когнитивные акты. Поэтому необходима локализация и на определенных структурах мозга. Такая локализация, так же как и локализация по времени, не может быть обеспечена фармакологическим воздействием.

Психотерапевтические методы ориентированы, прежде всего, на намерения, мотивы, ментальные стратегии пациента. Такие методы позволяют работать в реальном режиме времени и тем самым корректировать когнитивные процессы, опосредованно влияя и на динамические, пространственно локализованные биохимические процессы. К сожалению, возможности такого влияния в ряде случаев

недостаточны. Кроме того, многие психотерапевтические методы трудно формализовать и воспроизводить.

Нейрохирургические методы, в силу возможных опасных и необратимых последствий, вероятно, вообще не стоит подробно рассматривать в контексте психотерапии.

Физиотерапевтические методы позволяют локально и динамически воздействовать на когнитивные процессы. В основе такого воздействия лежат изменения биохимических процессов под действием различных физических факторов. В любом когнитивном процессе, как правило, одновременно протекает множество когнитивных актов, реализуемых различными участками мозга. По этим причинам физические методы имеют ряд существенных преимуществ перед другими методами (табл. 1).

Следует подчеркнуть, что первой и самой важной задачей при проведении

Таблица 1

Сравнение различных методов психокоррекции

Психофармакология	Психотерапия	Нейрохирургия	Физиотерапия
<ol style="list-style-type: none"> Отсутствие пространственной локализации (действуют на организм человека в целом). Отсутствие временной локализации (время действия существенно превосходит время когнитивного процесса). Многочисленные побочные эффекты. Сложность разработки новых препаратов. 	<ol style="list-style-type: none"> Сложность формализации. Зависимость от субъекта воздействия (психотерапевта). Зависимость от объекта воздействия (пациента). Недостаточная эффективность (сила воздействия). 	<ol style="list-style-type: none"> Высокая смертность пациентов. Возможность тяжелых физиологических побочных эффектов. Необратимость вмешательства. Опасность деградации и распада личности пациента. Высокая вероятность отсутствия ожидаемого результата. Длительная потеря трудоспособности пациента. Высокая стоимость вмешательства. 	<ol style="list-style-type: none"> Возможность временной локализации (возможность воздействия на головной мозг в течение любого сколь угодно короткого промежутка времени). Возможность пространственной локализации (возможность воздействия на заданные структуры мозга). Простота изменения под нужды конкретного пациента (простота изменения алгоритмов воздействия с учетом индивидуальных особенностей пациента) Минимальные побочные эффекты. Возможность синхронизации с психофизиологическими процессами пациента.

психотерапевтической стимуляции является обеспечение безопасности воздействия. Именно это накладывает главные ограничения на применяемые методики.

Проанализируем известные физиотерапевтические методы на предмет эффективности и безопасности воздействия.

Импульсная стимуляция с помощью долгосрочных вживленных электродов в настоящее время является одним из наиболее распространенных способов направленной коррекции структурно-функциональной организации мозга человека [1]. Применение этих весьма травматичных способов оправдано только в случае серьезных патологий и, вероятно, нецелесообразно в контексте психотерапии.

Судорожная электростимуляция предполагает генерацию в нервной ткани токов настолько большой силы, что они вызывают деполяризацию мембраны и потенциал действия. Хотя электросудорожная терапия и используется в психиатрии, наркологии, неврологии, а также исследованиях когнитивных функций [2], возможность применения ее в психотерапии является весьма спорной, поскольку необходимые при судорожной электростимуляции токи многократно больше физиологических.

Частицы с высокой энергией и жесткое излучение даже при невысоких интенсивностях могут вызывать необратимое повреждение тканей мозга и даже спровоцировать образование недоброкачественных опухолей. Поэтому риски применения таких методов в психотерапии, вероятно, нельзя считать оправданными.

Ультразвуковое воздействие на мозг человека рассматривалось, прежде всего, для задачи лечения опухолей [3], направленной лекарственной терапии [4],

уничтожения тромбов [5]. По-видимому, только фокусированный ультразвук может оказывать локализованное воздействие на подкорковые структуры [6]. Сегодня, однако, не проведены достаточно детальные клинические испытания ультразвуковой стимуляции, позволяющие утверждать, что данный тип воздействия вполне безопасен.

Ритмическая электрическая стимуляция, микрополяризация, транскраниальная магнитная стимуляция, ультразвуковая транскраниальная стимуляция, транскраниальный ультрафонофорез в контексте их применимости в психотерапии и психофизиологическом эксперименте были рассмотрены ранее [7, 8]. Приведем сравнительную таблицу этих методов (табл. 2).

Таким образом, при современном уровне развития науки можно говорить о безопасности и эффективности воздействия микрополяризации, ритмической электростимуляции и транскраниальной магнитной стимуляции. Ритмическую электростимуляцию и микрополяризацию можно осуществлять через общие электроды. Поскольку, как было показано [10], радиус электрода, обеспечивающего затекания более 5% тока в мозг, не может быть меньше 12 мм, а расстояние между электродами не может быть меньше их диаметра, нет необходимости создавать прибор более чем с 24 каналами стимуляции. Размер коиллов, стимулирующих головной мозг, не позволяет использовать более четырех каналов транскраниальной магнитной стимуляции одновременно. Биологическое управление может осуществляться по неэлектрическим маркерам психофункционального состояния, поскольку электрические помехи, наводимые электрической и магнитной стимуляцией,

Сводная таблица основных методов, применимых в психофизиотерапии и психофизиологическом эксперименте

Метод стимуляции	Локализация в пространстве	Локализация во времени	Область действия	Апробация в клинике
Микро-поляризация	10-30 мм	30-300 сек	Кора	Высокая
РЭС ¹	50-100 мм	1-60 сек	Кора и подкорковые структуры	Высокая
ТМС ²	30-60 мм	0,01-30 сек	Кора	Высокая
УЗС ³	Вероятно, 3-10 мм	Вероятно, 0,1-30 сек	Подкорковые структуры	Низкая

Примечание: ¹ – ритмическая электростимуляция (воздействие переменным током различной частоты и формы сигнала); ² – транскраниальная магнитная стимуляция; ³ – ультразвуковая стимуляция.

слишком велики и делают невозможным измерения. Измерение электрических маркеров психофункционального состояния (ЭЭГ, ЭКГ и т.д.) возможно сразу после окончания стимуляции.

Особенность применения методов электрической и магнитной стимуляции состоит в том, что, как правило, они используются самостоятельно. Для исследования независимых эффектов воздей-

ствия разных видов электромагнитной стимуляции и эффектов в результате интеграции этих воздействий для создания наиболее эффективных способов коррекции функционального состояния и когнитивных функций был создан уникальный прибор – многоканальный полимодальный динамический нейромодулятор с возможностью реализации биологической обратной связи (рис. 1).



Рис. 1. Прибор нейромодуляции (фото).

Данный прибор имеет следующие технические характеристики:

Технические характеристики блока транскраниальной, динамической, многоканальной электростимуляции:

- Количество каналов стимуляции – 24;
- Максимальная суммарная амплитуда тока каналов – 20 мА;
- Максимальная амплитуда тока канала – 20 мА;
- Полоса спектра генерируемых сигналов – 0-20 кГц;
- Форма сигнала в диапазоне частот пропускания – произвольная.

Генерация сигнала может осуществляться посредством:

- Виртуального синтезатора любого типа;
- Виртуального сэмплера, в том числе гранулярного;
- Произвольной комбинации сэмплеров и синтезаторов;
- Многоканальных эквалайзеров.
- Любая характеристика генерируемого сигнала может по произвольному закону задаваться психофизиологическими параметрами пациента.

Технические характеристики двухканального транскраниального магнитного стимулятора:

- Количество каналов стимуляции – 2;
- Виды индукторов, применяемых для стимуляции, – кольцевой и угловая восьмерка;
- Максимальная амплитуда магнитного поля – 2.5 Тл;
- Максимальная скорость нарастания магнитного поля – 30 Тл./сек.;
- Форма сигнала – однополярный, двухполярный;
- Частота следования генерируемого сигнала может по произвольному закону задаваться психофизиологическими параметрами пациента.

Возможности измерения психофизиологических параметров:

- ЭЭГ – 19 каналов и 2 референта;
- ЭКГ – 7 отведений;
- До 8 полиграфических каналов одновременно.

Управление генерируемыми сигналами может осуществляется в режиме реального времени посредством измеряемых физических маркеров психофункционального состояния пациента и терапевта, перемещения ручек виртуальных приборов на экране монитора, нажатия клавиш пианинной клавиатуры предварительно установленной последовательности (рис. 2).

Функциональная схема разработанного нами нейромодулятора представлена на рис. 3. Прибор состоит из четырех синхронно работающих компьютеров, к которым подключены генераторы сигналов и датчики регистрации физических маркеров физиологических параметров. Оператор может управлять комплексом как посредством обычных компьютерных клавиатур и мышей, так и посредством чувствительной к скорости нажатия пианинной клавиатуры. За счет применения пианинных клавиатур осуществляется динамическое градуальное управление потоком паттернов стимуляции. Прием, запись и динамическая обработка сигналов осуществляется посредством ПК4. К этому компьютеру приходят данные от полиграфических датчиков, электроэнцефалографических датчиков и кнопочного отметчика событий (кнопочный отметчик событий служит для фиксации реакции пациента на события). Данные с ПК4 через платы синхронизации поступают на центральный компьютер – ПК3. Центральный компьютер управляет сценарием модуляции. Параметры такого сценария

могут варьироваться как посредством данных, получаемых от пациента, так и посредством органов управления, находящихся в распоряжении оператора. К таким органам управления, наряду с обычной компьютерной клавиатурой и мышью, относится пианинная клавиатура, подключенная к ПК3 через плату синхронизации. Кроме того, центральный компьютер управляет восьмиканальной акустической системой, двухканальным транскраниальным магнитным стимулятором и двумя свободными каналами, к которым могут подключаться произвольные приборы стимуляции – например, фотовспышка и кинестетические стимуляторы. Управляющие сигналы с центрального компьютера через плату синхронизации поступают на ПК1 и ПК2. На этих компьютерах установлены виртуальные синтезаторы сигналов. Параметры сигналов этих синтезаторов задаются центральным компьютером ПК3. Каждый из компьютеров (ПК1 и ПК2)

синтезируют сигналы по двенадцати каналам. Данные цифровые сигналы, проходя через два параллельно работающих цифроаналоговых преобразователя, и управляют работой 24-канального генератора тока – электростимулятора.

В качестве операционной системы, установленной на компьютерах, выбрана наиболее устойчивая на момент создания прибора система Windows XP. Для динамического управления параметрами стимуляции используется виртуальная музыкальная студия CUBASE, для синтеза сигналов используется виртуальный синтезатор РЕАКТОР и, наконец, для записи и передачи физических маркеров психофункционального состояния применен программно-аппаратный комплекс ЭНЦЕФАЛАН-РЕАКОР.

Благодаря универсальности воздействия и гибкости изменения алгоритмов нейромодулятор может быть полезным инструментом в клинических испытаниях новых методик нейростимуляции.

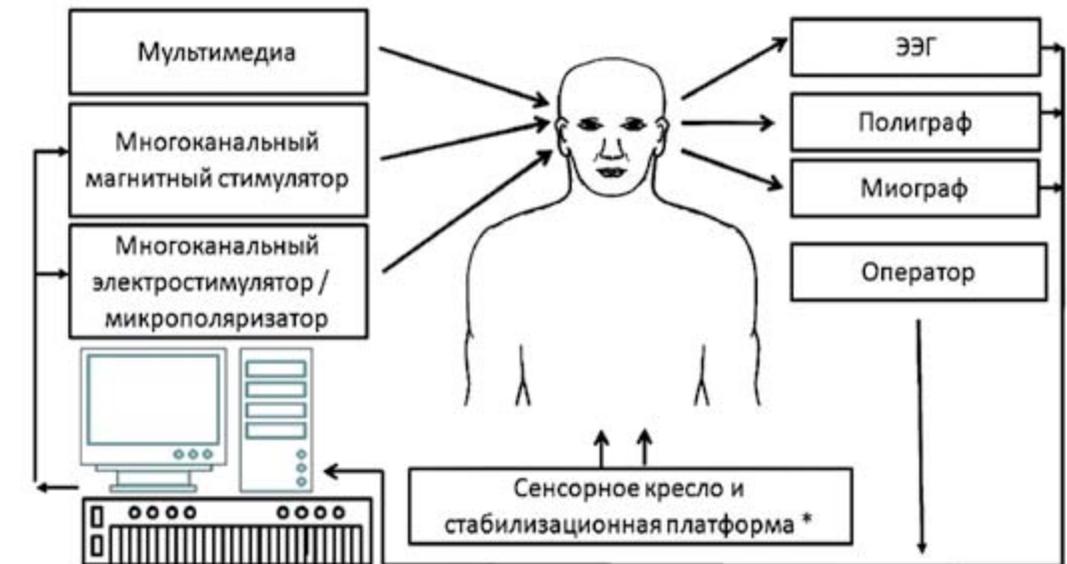


Рис. 2. Функциональная схема управления нейромодуляцией (* – оборудование планируется к закупке в 2012 г.).

Рассмотрим для иллюстрации перспективы его применения в контексте классической психодинамической терапии.

Одной из основных техник классического психоанализа является техника свободных ассоциаций. Целью этой техники является вербальное проявление импульсов Ид через блокаду Эго. Иногда импульсы Ид прорываются через контроль Эго, что выражается в символах сна, оговорках, неврозах. Техника свободных ассоциаций направлена на исследование импульсов Ид, на воспроизведение событий из прошлого посредством регрессии и перемещения по следу актуального переживания. Оживляя инфантильные конфликты, пациент и аналитик исследуют путь, которым их ведут свободные ассоциации. Полное оживление инфантильных конфликтов затруднено тем, что мозг взрослого человека анатомически и функционально отличается от мозга ребенка. Таким образом, естественно предположить, что возрастная регрессия, совмещенная с частичным усыплением пациента, может дать необходимый эффект. Торможение фронтальной коры и третьичных зон обоих полушарий посредством транскраниальной микрополяризации и преимущественная модуляция медленных ритмов посредством транскраниальной магнитной стимуляции позволит осуществить возрастную регрессию [7]. Электросон с контролируемой по фотоплетизмограмме и датчикам дыхания амплитуде стимулирования позволит поддерживать заданный уровень бодрствования пациента [9].

Другой важной техникой психоанализа является техника преодоления сопротивлений и, в частности, сопротивления Суперэго, возникающего из бессознательного чувства вины и необходимости наказания. Важным механизмом форми-

рования Суперэго, включая его патологические проявления, является идентификация, т.е. включение черт другого человека в свое Я, происходящее обычно в детском возрасте. Поскольку анализу обычно подвергается взрослая личность, работа с Суперэго, сформировавшимся в детском возрасте, затруднена тем, что анатомически и функционально мозг взрослого человека существенно отличается от мозга ребенка. Описанная выше методика возрастной регрессии может оказаться полезной и в решении этой задачи.

Сопротивление Ид также часто формируется в раннем возрасте, когда слабое инфантильное Эго еще не в силах сублимировать удовлетворение потребностей Ид в социально приемлемые формы. Для выявления механизмов подобного сопротивления представляется полезной возрастная регрессия с усилением Ид и ослаблением Эго. Напротив, для преодоления сопротивления и инсайта необходимо усиление Эго, осознающего ослабленные импульсы Ид. В целом, поскольку замена Ид на Эго является ключевой целью психоанализа, усиление Эго с помощью стимуляции фронтальной коры левого полушария и третьичных зон обоих полушарий посредством транскраниальной микрополяризации и транскраниальной магнитной стимуляции [7] может рекомендоваться как физиотерапевтический инструмент психоанализа.

Для установки стимуляторов над заданными структурами мозга и расчета токов при микрополяризации можно использовать разработанные нами ранее методики [10, 11].

В заключении следует подчеркнуть, что данная методика требует обязательной экспериментальной апробации и уточнения. Целью настоящей публика-

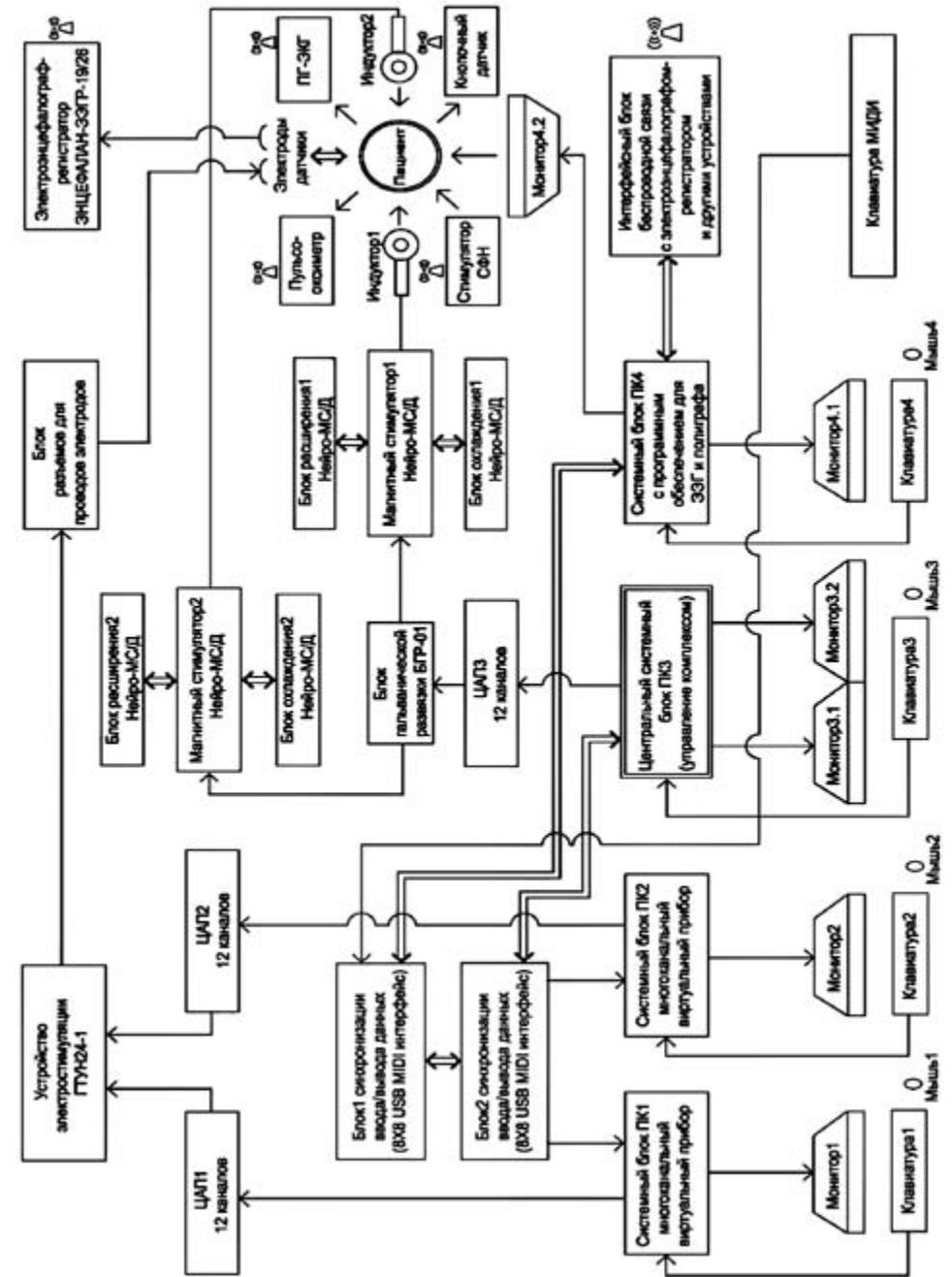


Рис. 3. Функциональная схема нейромодулятора.

ции является приглашение к сотрудничеству психотерапевтов и физиотерапевтов для клинической апробации высказанных выше гипотез на нашей экспериментальной базе.

Список литературы

1. *Бехтерева Н.П., Анничков А.Д., Гурчин Ф.А., Дамбинова С.А., Илюхина В.А. и др.* Лечебная электрическая стимуляция мозга и нервов человека / под ред. Н.П. Бехтеревой.-М.: АСТ; СПб.: Сова; Владимир: ВКТ. 2008. 464 с.
2. *Нельсон А.И.* Электросудорожная терапия в психиатрии, наркологии и неврологии // М., БИНОМ. 2010.
3. *Fry F.J.* Transkull transmission of an intense focused ultrasonic beam // *Ultrasound. Med. Biol.* 1977; 3:179-184.
4. *Hynynen K., McDannold N., Vykhodtseva N., Jolesz F.A.* Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits // *Radiology* 2001; 220:640-646. [PubMed: 11526261].
5. *Behrens S., Spengos K., Daffertshofer M., Schroeck H., Dempfle C.E., Hennerici M.* Transcranialultrasound-improved thrombolysis: diagnostic vs. therapeutic ultrasound // *Ultrasound Med. Biol.* 2001; 27:1683-1689. [PubMed: 11839413].
6. *Гаврилов Л.Р., Цирюльников Е.М.* Фокусированный ультразвук в физиологии и медицине // Л.: Наука. 1980.
7. *Чудина Ю.А., Чайванов Д.Б.* Применение нейростимуляции для коррекции особенностей личности в процессе транзактного анализа // «Вестник РУДН». 2011. № 4. Серия «Психология, педагогика».
8. *Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А.* Нейромодулятор как инструмент психофизиотерапии. “Инновационные технологии в медицине”, 26-28 октября 2011 г. Санкт-Петербург.
9. *Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А.* Применение биоуправляемого электросна для поддержания оптимального возбуждения головного мозга человека при обучении эффективным когнитивным стратегиям «Высшая школа: опыт, проблемы, перспективы», 19-20 апреля 2011 г. РУДН.
10. *Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.* Математическая модель биофизических процессов при транскраниальной микрополяризации // *Биомедицина*. 2011. № 3.
11. *Варманов А.А., Варманов А.В., Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б.* Локализация проекции полей Бродмана коры головного мозга человека на поверхность скальпа // *Биомедицина*. 2011. № 3.

Hardware of physical methods of psychotherapy

N.N. Karkishchenko, D.B. Chayvanov

In article technologies of neuromodulation and its application in the context of psychoanalyses are consider.

Key words: psychotherapy, physiotherapy, neurotherapy, neurostimulation.



РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

Оценка эффективности антибиотиков и бактериофагов альтернативными методами

Н.Н. Каркищенко, Л.Ю. Завальский

ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, Московская область

Контактная информация: академик РАРАН, член-корр. РАМН
Николай Николаевич Каркищенко niknik2808@yandex.ru

В статье обсуждаются некоторые альтернативные способы биологического моделирования, в частности – способы определения активности антибиотиков и специфических бактериофагов в сравнении с традиционными методами лекарственной диагностики. Внедрение в практику новых методов имеет целью ускорение диагностики – минуты и часы против суток для принятой доклинической и клинической лабораторной практики.

Ключевые слова: антибиотики, бактериофаги, фаги, рост, движение, взаимодействие клеток, хемотаксис, тензор и анизотропия поляризуемости клеток, электрооптика.

Традиционные лабораторные методы изучения антибиотиков и бактериофагов включают:

- посев клеток на агаризованную среду, содержащую антибиотик;
- спот-тестирование фагового образца на бактериальном газоне;
- факт образования и размер выросших на газоне колоний;
- время определения – сутки.

В результате этих измерений получается интегральная характеристика – размер колоний, образовавшихся в результате гетеротрофного взаимодействия на границе субстрат-клетка.

В основу одного из альтернативных способов оценки эффективности антибиотиков и бактериофагов положено подавление хемотаксической активности бактериальных клеток антибиотиками и бактериофагами. Регистрируемыми величинами являются:

- смещение фронта бактериальной популяции в случае неметаболизируемого субстрата;
- скорость распространения фронта бактериальной популяции в случае неметаболизируемого субстрата;
- смещение мигрирующей полосы бактерий в случае метаболизируемого субстрата;
- скорость мигрирующей полосы бактерий в случае метаболизируемого субстрата;
- спектр: число, ширина (с учетом дисперсии) и площадь мигрирующих полос – количественно выражающий пространственное распределение концентрации бактерий в полосах;
- максимальная концентрация бактерий в полосах;
- интегральный параметр хемотаксиса, выражающий общее количество мигрировавших через границу клеток в результате хемотаксиса.

Разработанная математическая модель и реализованная на компьютере программа «СHEMOTAXIS» позволяют решать прямую и обратную задачу. То есть на основании микропараметров движения отдельной клетки прогнозировать движение популяции в целом при заданных пространственно-временных химических градиентах окружающей среды. Наоборот, из картины движения популяции в условиях пространственно неоднородной среды можно выявлять физиологические характеристики отдельных участвующих в движении клеток. Присутствие в жидкости фагов или активного химического вещества, включая антибиотики, тормозит процесс образования и миграции бактериальной популяции на среде с антибиотиком или фагов на бактериальной среде. При этом, чем выше концентрация антибиотика, тем ниже скорость миграции бактериальной полосы. Точность определения аналогична точности традиционного способа определения концентрации (ошибка 10%) – путем измерения размера колоний на чашках Петри с полужидким агаром, содержащим фаги или антибиотик. Предлагаемая оценка с использованием хемотаксиса бактерий при сохранении точности определения позволяет повысить чувствительность стандартных методов, а также ускорить диагностику с 18-24 до 1 ч (хемотаксис можно наблюдать уже через 5 мин после введения тест-культуры в раствор антибиотика) [1, 3-9].

Нами также было продемонстрировано изменение хемотаксиса бактерий *Campylobacter jejuni* при действии связывающегося с флагеллами бактериофага PV22. В результате связывания с фагом хемотаксис бактерий снижался. Уменьшалось как общее число бактерий, проникающих в зону действия аминокислот, так и скорость формирования и миграции

бактериальных полос. Таким образом, было показано, что традиционные исследования, принятые в бактериофагии и вирусологии, могут быть дополнены физико-химическими способами измерения реакции хемотаксиса взаимодействующих с фагом бактерий [10].

Другой альтернативный метод исследования эффективности действия антибиотиков и бактериофагов основан на электрооптическом анализе электрофизических свойств бактериальных клеток по изменению оптических свойств суспензии при высокочастотной ориентации в электрическом поле [2]. Измеряемым параметром здесь является анизотропия поляризуемости, которая представляет собой разность продольной и поперечной компонент тензора поляризуемости. Тензор поляризуемости является интегральным параметром, который отражает распределение и величину индуцированных зарядов. Эти заряды клетки меняются при воздействии на них антибиотиками и бактериофагами, причем оптический эффект, как и хемотаксис, являются строго видоспецифичными, что позволяет получать подробную количественную информацию – так называемые спектры взаимодействия клетки с антибиотиками и фагами. Разработан универсальный электрооптический анализатор клеток ЭЛБИК и различные модификации устройств пробоподготовки и пробоотбора. Программное обеспечение в среде Builder 5.0 решает проблемы, связанные с измерениями, математической обработкой и интерпретацией экспериментальных данных.

Преимущества предложенных методов по сравнению с традиционными:

- Время анализа системы фаг-клетка и антибиотик-клетка сокращается до нескольких минут.

- Появляется возможность получения большого объема количественной информации благодаря математической модели и компьютерной обработке экспериментальных данных.

Вывод

Методы хемотаксиса и электрооптики являются перспективными направлениями исследования в лекарственной диагностике, позволяя за короткое время на основании существующих моделей и компьютерной обработки данных получать значительное количество существенной информации, взамен интегральной характеристике, получаемой с помощью традиционных методов диагностики.

Список литературы

1. *Брезгунов В.Н., Завальский Л.Ю.* Способ определения динамики таксиса анизотропных по форме микроорганизмов // А.С. №1155428 СССР АС 12 N 1/00. 1985.
2. *Бунин В.Д.* Прибор и программное обеспечение для получения и интерпретации электрооптических спектров растущих и взаимодействующих с фагами клеток / Доклад на Российско-Германском симпозиуме по биотехнологии. 2005.
3. *Завальский Л.Ю.* Кинетический анализ поведения популяции хемотаксичных бактерий на границе раздела двух сред // Биофизика. 2003. Т.72. Вып.3.

С.1281-1287.

4. *Завальский Л.Ю.* Кинетический анализ хемотаксиса бактерий // Биофизика. 1988. Т.33. С. 328-332.

5. *Завальский Л.Ю.* Кинетическое описание движения бактерий при хемотаксисе // Биофизика. 1985. Т.30. №1. С. 93-97.

6. *Завальский Л.Ю.* Разработка биосенсора для определения концентрации вредных примесей в окружающей среде с использованием хемотаксиса бактерий // доклад на междунар. конф. «Наука и бизнес» – Пущино, 16-19 марта 2004.

7. *Завальский Л.Ю.* Способ определения концентрации антибиотиков на основе хемотаксиса бактерий // АС №1650702 СССР АС 12Q 1/04.1988.

8. *Завальский Л.Ю., Брезгунов В.Н., Светогоров Д.Е., Попов В.Г.* Изменение оптической плотности суспензии бактерий при хемотаксисе // ДАН СССР. 1984. Т.289. С. 488-491.

9. *Завальский Л.Ю., Марченко А.И., Боровик Р.В.* Изучение хемотаксиса бактерий к нафталину // Микробиология. 2003. Т.72. Вып. 3. С. 363-368.

10. *Zhilentov E.L., Popova V.M., Zavalsky L.Yu., Svetoch E.A., Stern Norman J., Seal Bruce S.* The ability of flagellum-specific *Proteus vulgaris* bacteriophage PV22 to interact with *Campylobacter jejuni* flagella in culture // Virology Journal 2006. 3:50.

Assessment of antibiotics and bacteriophages by alternative methods

N.N. Karkishchenko, L.Yu. Zavalsky

In article some alternative ways of biological modeling, in particular – ways of determination of activity of antibiotics and specific bacteriophages in comparison with traditional methods of medicinal diagnostics are discussed. Introduction in practice of new methods has for an object diagnostics acceleration – minutes and hours against days for the accepted non-clinical and clinical laboratory practice.

Key words: antibiotics, bacteriophages, phage, growth, movement, interaction of cages, chemotaxis, tensor and anisotropy of polarizability of cages, electrooptics.

Планирование доклинических исследований на светлогорских мини-свиньях в имплантологии

А.А. Кулаков¹, В.А. Бадалян¹, Г.Д. Капанадзе²

¹ – ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Минздравсоцразвития РФ, Москва

² – ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, Московская область

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

Проведена экспериментальная работа на 8 мини-свиньях для определения процессов заживления и остеоинтеграции после формирования ложа под имплантат при помощи традиционных фрез и пьезозондированных насадок. Сроки наблюдений составили 1, 30, 90 и 180 дней. Были проведены рентгенологические, гистологические, гистоморфометрические исследования, в результате которых выявлена разница в группе, где применялись пьезохирургические насадки в сторону ускорения процессов интеграции и оптимизации заживления раневого процесса.

Ключевые слова: имплантаты, мини-свиньи, техника хирургического вмешательства, препарирование ложа под имплантат традиционными фрезами, пьезохирургия.

Изучение явления интеграции имплантата в костную ткань является важнейшей задачей хирургии и стоматологии. Исследования биосовместимости, первичной стабильности и надежности использования имплантатов проводятся как *in vitro*, так и *in vivo*. Экспериментальные исследования на тканях животных с целью имплантации известны с 1800 г. Однако вопросы оптимизации протокола проведения имплантации стали наиболее актуальными в последние 20 лет. Результаты, полученные в ходе доклинических исследований, позволяют значительно улучшить качество жизни людей [19].

Для расширения сферы исследовательской деятельности в этом направлении необходимы:

- поиск новых материалов для изготовления имплантатов, которые способны выдерживать значительные функциональные нагрузки;

- поиск оптимальных методик в инженерии тканей;
- получение информации о биологических реакциях организма на имплантацию того или иного материала.

Определение формы имплантата и области проведения имплантации необходимо проводить, основываясь на оценке большого количества биологических и химических реакций, происходящих в организме человека, а также на сам материал имплантата, его поверхность и те нагрузки, которые возникают в окружающих тканях в ответ на механическую травму, обусловленную введением имплантата.

В связи с этим, возникла необходимость определить:

- 1) оптимальную экспериментальную модель для проведения доклинических исследований в имплантологии;
- 2) сроки и протокол хирургических вмешательств при операции имплантации;

3) возможности патогистологических исследований, исходя из выбранной модели для доклинических исследований.

Выбор экспериментальной модели обычно базируется на следующих параметрах: расходы на приобретение и содержание животных; биоэтические нормы использования животных в острых экспериментах (эксперименты данного характера, как правило, включают себя гистологические исследования); устойчивость к инфекциям; удобные хирургические доступы; относительное анатомическое, биологическое и физиологическое сходство с человеком; возможность экстраполяции полученных результатов на человека [15].

К тому же, продолжительность жизни лабораторных животных выбранного вида должна быть не короче, чем сроки исследования. Для изучения взаимодействия «кость-имплантат» очень важной составляющей является сходство микроструктурного состава кости животных и человека, и, наконец, размер животного или исследуемого органа должен соответствовать таковому у человека.

Для определения регенерации периодонта до последнего времени собаки использовались в 32%, нечеловеческие приматы – в 16%, крысы – в 11%, кролики – в 4%, свиньи – в 2%, овцы – в 1% исследований [13].

Несмотря на то, что собаки из-за кинетики заживления и анатомии зубов являются сходной моделью с человеком [21], экономические условия, размеры животных, биоэтические преграды создают определенные проблемы для проведения острого эксперимента.

Многочисленные исследования в хирургической стоматологии и ортопедии (почти 35%) на первоначальных стадиях проводятся с использованием кроликов.

Это объясняется относительной дешевой моделью, быстрыми сроками физиологического созревания, удобством содержания и кормления в лабораторных условиях этих животных. Недостатками при использовании кролика как животной модели является его размер и расхождение по строению костной ткани в сравнении с человеческим. Более того, кролики по микроструктуре кости очень отличаются от людей [20].

Из крупных лабораторных животных для проведения биомедицинских экспериментов, в том числе и костной имплантации, с учётом сходства зубочелюстного аппарата, многие зарубежные исследователи предпочтение отдают мини-свиньям [5, 6, 10, 11]. По макроструктуре, анатомии, морфологии, минерализации и заживлению костной ткани свинья считается лабораторным животным, имеющим наибольшее сходство с человеком [14, 15, 17]. Минеральный состав кости мини-свиньи похож на таковой человека [4].

В литературных источниках отмечается, что процессы костного ремоделирования у свиней (т.е. перестройка уже имеющейся структуры кости) аналогичны процессам, происходящим у человека [7, 8].

При сравнении скоростей регенерации костной ткани у собак, мини-свиней и людей выявлено, что у последних двух они сходны (у собак – 1,5-2 μm в день; у мини-свиней – 1,2-1,5 μm в день; у человека – 1-1,5 μm в день) [12].

Свинья, как и человек, пережёвывает, перетирает пищу. Действие жевательной мускулатуры у собак аналогично таковому у свиней, но отличается возможностью очень широкого разведения челюстей, сильного их смыкания. Движения в боковые стороны у неё отсутствуют [1, 2, 9].

На основании вышеизложенного, можно заключить, что для изучения процессов остеоинтеграции и заживления мягких тканей при имплантации в качестве экспериментальной модели предпочтение отдается использованию мини-свиней [3, 18, 22].

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проведено на базе ФГБУ «НЦБМТ» РАМН. Животных содержали в виварии лаборатории биомедицины в стандартных станках индивидуально. Кормили комбикормом для свиней ПК 58, воду животные получали вволю. Поддерживалась температура 20-22°C и влажность 60-70%. Освещение естественное.

Протокол исследования перед началом опыта был рассмотрен и одобрен биоэтической комиссией ФГБУ «НЦБМТ» РАМН. В эксперименте использовались 8 голов светлогорских мини-свиней (половозрелые самцы с постоянными зубами). Изначальная масса животных – 35кг±15%. Все операции осуществлялись с применением препарата «Золетил» (Вирбак, Франция). Перед наркозом за 30 мин проводилась премедикация внутримышечным введением растворов дроперидола, атропина и седуксена. На первом этапе были удалены зубы (резцы и клыки) с 2-х сторон на верхней челюсти. Через 2 мес. на втором этапе в область удалённых зубов установлены винтовые имплантаты системы



а) слева



б) справа

Рис. 1. Вид тканей до хирургического вмешательства.



Рис. 2. Формирование ложа для имплантации в лунке удаленного зуба и в костной ткани.

«Astra» (Швеция), «Xi-Ve» (Германия) и «Implantium» (Корея), по 2 имплантата с каждой стороны (рис. 1а, б). Выведение животных из эксперимента проводили путем пропускания через тело электрического тока из городской сети.

В некоторых случаях было проведено удаление и одномоментная установка имплантатов в лунку.

Ложе имплантата сформировано при помощи традиционных боров и фрез. Разрезы проведены с применением тра-



Рис. 3. Операционное поле после установки имплантатов.

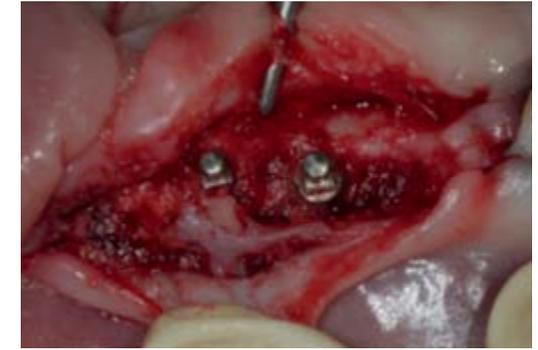


Рис. 4. Формирование ложа при помощи пьезохирургических насадок и установка имплантатов.

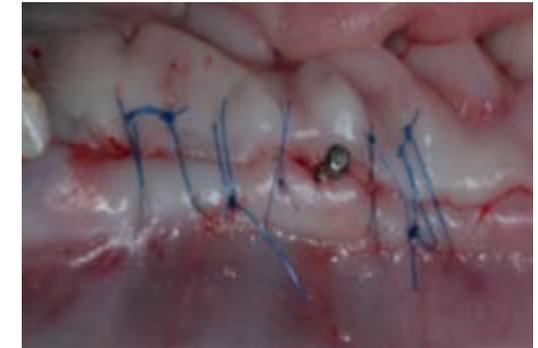
диционных скальпелей, рана ушита нитью Vicryl № 3 (рис. 2, 3).

Также разрезы были проведены с помощью микроскальпелей, ложе имплантата сформировано пьезохирургически-

ми насадками (рис. 4). Наложены швы Prolene № 6 и 7 (рис. 5а, б). Кроме этого, для определения состояния стенок ложа, сформированного под имплантаты с использованием различных методов, в одну

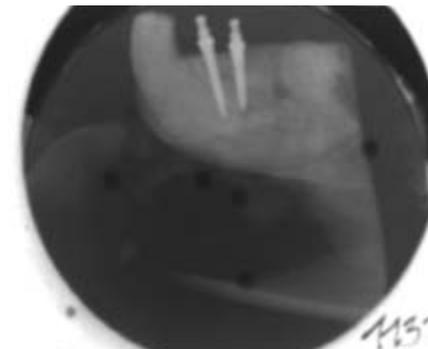


а

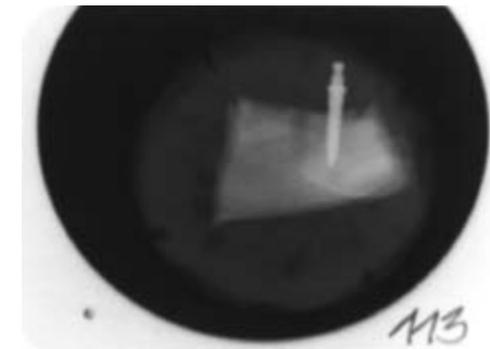


б

Рис. 5. После ушивания раны Vicryl №3 (а) и Prolene №6 (б).



а



б

Рис. 6. Рентгенография тканевых фрагментов слева (а) и справа (б).

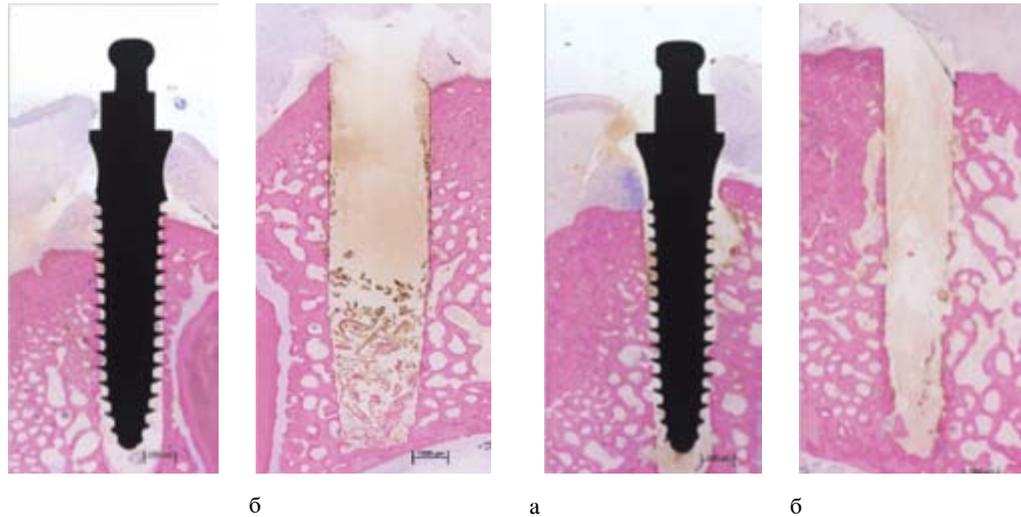


Рис. 7. Патогистологическое исследование тканевых фрагментов:
а – один имплантат;
б – ложе, сформированное под имплантат, при помощи фрез. Ложе заполнено костной стружкой, края костной раны гладкие, компрессия незначительная. Новообразованная костная ткань окрашена в темнофиолетовый цвет, «старая» кость – в светлофиолетовый, мягкие ткани – в голубой (недекальцинированные шлифы, окрашены азури II и параросанилин, натуральное увеличение х 50).

Рис. 8. Патогистологическое исследование тканевых фрагментов:
а – установленный имплантат;
б – ложе, сформированное под имплантат при помощи пьезохирургических насадок; минимальная фиксация имплантата в кости. При анализе поперечного среза ложа имплантата, в ране не выявлено костных опилок, в области дна определяется неровная поверхность и отсутствие компрессии костной ткани вокруг нее.

из лунок с каждой стороны инсталляция имплантатов не проводилась (в группе исследования 1-х суток).

В послеоперационном периоде животным созданы надлежащие условия ухода и питания. Сроки выведения мини-свиней из эксперимента – 1, 30, 90, 180 суток.

Тканевые фрагменты, полученные из области экспериментального исследования, направлены на гистологию (рис. 7, 8). Животные были выведены из эксперимента внутримышечной инъекцией листенона.

Недостатком, который необходимо учитывать при планировании доклинических исследований в имплантологии на мини-свиньях, является плотность костной ткани (D 1), что очень важно при-

нимать во внимание при формировании ложа под имплантат.

Для использования мини-свиней в качестве экспериментальной модели необходимо учитывать следующие рекомендации:

1. Четкое планирование экспериментальной модели, что исключит неточности и потерю времени при проведении самого эксперимента.
2. При планировании исследований, проводимых при установке имплантатов, следует использовать имплантаты маленького диаметра (2; 2,5; 3 мм) и длиной не более 11 мм.
3. Удаление зубов в некоторых случаях не является обязательным, так как промежутков между зубами достаточно

для установки имплантата. Можно также установить имплантат в лунку непосредственно сразу после удаления.

4. Необходимо проведение рентгенологического исследования на всех этапах: до и после операции, во время выведения животных из эксперимента (это даст возможность правильно оценить изучаемую область).

5. Биологические особенности мини-свиней позволяют совместить 2 экспериментальные модели (например, имплантация и увеличение объема гребня, или операции на мягких тканях).

Заключение

Проведенное исследование убедительно продемонстрировало, что мини-свиньи являются оптимальной моделью при изучении имплантации с использованием различных методов для формирования ложа под имплантат. Выбранная экспериментальная модель позволяет в течение достаточного количества времени оценить состояние костной и мягкой тканей в ране оперированной зоне. За время проведения эксперимента не произошло потери ни одного животного. Все установленные имплантаты интегрировались, что позволило провести объективную ступенчатую оценку остеоинтеграции.

Список литературы

1. Ашурев Ж.А., Кулаков А.А., Капанадзе Г.Д. Использование мини-свиней в экспериментальной имплантологии // Биомедицина. 2007. №6. С. 81-88.
2. Капанадзе Г.Д. Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах // Биомедицина. 2006. №2. С. 40-51.
3. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В. Междисциплинар-

ные исследования в медицине. М.: Техносфера. 2007. 368 с.

4. Aerssens J., Boonen S., Lowet G., Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research // Endocrinology . 1998. Vol. 139. № 4. P. 663-670.

5. Block M.S., Gardiner D., Almerico B., Neal C. Loaded hydroxyapatite-coated implants and uncoated titanium-threaded implants in distracted dog alveolar ridges // Oral Surg. 2000. –Vol. 89. № 6. P. 676-685.

6. Gaggi A., Schultes G., Regauer S., Karcher H. Healing process after alveolar ridge distraction in sheep // Oral Surg. 2000. Vol. 90. № 4. P. 420 - 429.

7. Mosekilde L., Kragstrup J., Richards A. Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs // Calcif. Tissue Int . 1987. Vol. 40. P. 318-322.

8. Mosekilde L., Weisbrode S.E., Safron J.A., Stills H.F., Jankowsky M.L., Ebert D.C., Danielsen C.C., Sogaard C.H., Franks A.F., Stevens M.L., Paddock C.L., Boyce R.W. Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation // Bone. 1993. Vol. 14. P. 379-382.

9. Newman E., Turner A.S., Wark J.D. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models // Bone. 1995. Vol. 16. P. 277S-284S.

10. Oda T., Sawaki Y., Ueda M. Experimental alveolar ridge augmentation by distraction osteogenesis using a simple device that permits secondary implant placement // Int J. Oral Maxillofac. Implants. 2000. Vol. 15. P. 95-102.

11. Osaka Y., Kitano S., Wada K., Komori T. Endosseous implants in horizontal

- alveolar ridge distraction osteogenesis // Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 2002. Vol. 17., № 4. P. 846-853.
12. **Pearce A.I., Richards R., Milz S., Schneider E.** Animal models for implant biomaterial research in bone // Europ. Cells and Materials. 2007. Vol. 13. P. 1-10.
13. **Pellegrini G., Seol Y.G., Gruber R., Giannobili W.V.** Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies // J. Dent. Res. 2009. Vol. 88. P. 1065-1076.
14. **Raab D.M., Crenshaw T.D., Kimmel D.B., Smith E.L.** A histomorphometric study of cortical bone activity during increased weight-bearing exercise // J. Bone Miner. Res. 1991. Vol. 6. № 4. P. 741-749.
15. **Schimandle J.H., Boden S.D.** Spine update. The use of animal models to study spinal fusion // Spine. 1994. Vol. 19. P. 1998-2006.
16. **Swindle M.M., Smith A.C., Hepburn B.J.** Swine as models in experimental surgery // J. Invest. Surg. 1988. №1 P. 65-79.
17. **Thorwarth M., Schultze-Mosgau S., Kessler P., Wiltfang J., Schlegel K.A.** Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite // J. Oral Maxillofac. Surg. 2005. Vol. 63. P. 1626-1633.
18. **Tumbleson M.E., Schook L.B.** Advances in swine biomedical research. New York, 1996. С. 1-19.
19. **Voigt J., Borysiewicz L.** Uniting research into human and animal health // Vet. Rec. 2010. Vol. 166. № 13. P. 406-407.
20. **Wang X., Mabrey J.D., Agrawal C.M.** An interspecies comparison of bone fracture properties // Biomed. Mater. Eng. 1993. Vol. 8. P. 1-9.
21. **Wikesjo U.M., Selvig K.A., Zimmerman G., Nilveus R.** Periodontal repair in dogs: healing in experimentally created chronic periodontal defects // J. Periodontol. 1991. Vol. 62. P. 258-263.
22. **Wikesjo U.M., Sigurdsson T.J., Lee M.B., Tatakis D.N., Selvig K.A.** Dynamics of wound healing in periodontal regenerative therapy // J. Calif. Dent. Assoc. 1995. Vol. 23. P. 30-35.

Planning of preclinical researches in implantology on mini-pigs

A.A. Kulakov, V.A. Badalyan, G.D. Kapanadze

To determine the processes of healing and osteointegration, after implant bed preparation with traditional burs in compare with piezosurgical tips were done on the 8 mini-pigs in experiment. The follow-up was 1, 30, 90 and 180 days. Radiological, histological, histomorphometric study were performed. In group with piezosurgical tips showed accelerating the integration and optimization of the wound healing processes.

Key words: implants, mini-pigs, surgical technique, traditional implant bed preparation, piezosurgery, osteointegration.

Влияние биомеханических свойств корнеосклеральной капсулы глаза на гидродинамику внутриглазной жидкости

Е.Н. Иомдина¹, О.А. Киселева¹, Л.А. Назаренко¹, Н.Ю. Игнатьева², В.Н. Баграташвили³

¹ – ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздравсоцразвития, Москва

² – МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

³ – ФГБУН Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Троицк

Контактная информация: д.б.н. Иомдина Елена Наумовна iomdina@gmail.com

Предполагают, что нарушение биомеханических свойств склеры в области диска зрительного нерва и корнеосклеральной оболочки глаза в целом может играть существенную роль в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ). Цель работы: экспериментальное изучение влияния биомеханических свойств склеры на состояние гидродинамики внутриглазной жидкости (ВЖ). Для этого определяли механические характеристики и уровень поперечных сшивок коллагена склеры, а также гидродинамические показатели 1) интактных глаз молодых (2-х-месячных) и старых (2-х-летних) кроликов; 2) глаз, подвергнутых *in vivo* воздействию трезозы, повышающей поперечную связанность коллагена; 3) глаз молодых и старых кроликов, а также кроликов, подвергнутых *in vivo* воздействию трезозы, после воздействия *in vivo* протеолитическим ферментом (коллагелином). Гидродинамические показатели оценивали с помощью Глаутест 60. Для определения уровня поперечной связанности коллагена склеры использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии. Биомеханические показатели склеры оценивали с помощью Autograph AGS-H. Показано, что нормальное возрастное увеличение жесткости (модуля упругости) склеры с $23,1 \pm 4,2$ МПа до $41,4 \pm 6,3$ МПа сопровождается умеренным ростом поперечных сшивок и незначительным снижением оттока ВЖ. В то же время повышение жесткости склеры (до $65,4 \pm 6,0$ МПа), вызванное воздействием трезозы, т.е. патологическим ростом уровня поперечной связанности, сопровождается небольшим повышением внутриглазного давления и значимым ухудшением оттока ВЖ. Под воздействием коллагелина у старых животных снизилась жесткость склеры (до $27,9 \pm 4,9$ МПа) и улучшилась гидродинамика ВЖ, соответствующие показатели у молодых животных изменились незначительно. Жесткость склеры, обработанной трезозой и содержащей избыточные поперечные сшивки, также снизилась под воздействием коллагелина (до $43,4 \pm 4,5$ МПа), при этом улучшилась гидродинамика ВЖ. Очевидно, биомеханические свойства склеры оказывают влияние на гидродинамику глаза: при повышении жесткости склеры за счет избыточного формирования поперечных связей в ее коллагеновых структурах отток ВЖ снижается, что может быть фактором развития ПОУГ. Протеолитическая терапия с помощью коллагелина дает возможность снизить число таких сшивок, уменьшить жесткость склеры и улучшить гидродинамические показатели глаза.

Ключевые слова: склера, внутриглазная жидкость, коллаген, поперечные связи, модуль упругости, глаукома.

Введение

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – многофакторное заболевание глаза, характеризующееся повышением внутриглазного давления (ВГД), прогрес-

сирующей атрофией зрительного нерва и сужением поля зрения, приводящее к необратимой утрате зрительных функций [12, 13]. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в последние годы в лече-

нии этого тяжелого заболевания, частота ПОУГ растет: по оценке ВОЗ в 2010 г. численность больных глаукомой составляла около 60 млн, а к 2020 г. она вырастет почти до 80 млн человек [26]. Именно поэтому по-прежнему актуальным является изучение патогенеза глаукомного поражения и разработка эффективных мер его профилактики и лечения.

Согласно современным представлениям, нарушение биомеханических свойств склеры в области решетчатой пластины и диска зрительного нерва, трабекулярной ткани и всей корнеосклеральной оболочки глаза в целом может играть существенную роль в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы [4, 10, 11, 16, 19, 27].

Полученные различными исследователями данные свидетельствуют о наличии тесной связи между биомеханическими свойствами трабекулярной ткани, решетчатой пластины и собственно склеры, а также об изменении свойств этих структур при развитии глаукомного процесса [18, 19, 21].

В работе [15] с использованием метода динамической ригидометрии установлено возрастание ригидности склеральной ткани при ПОУГ уже в самом начале заболевания, которое значительно превышало возрастные изменения этого показателя. Определение амплитуды глазного пульса и пульса глазного дна методом пневмотонометрии и лазерной интерферометрии позволило выявить повышенную жесткость структур глаза, в том числе склеры, у пациентов с различными стадиями ПОУГ при медикаментозно компенсированном ВГД [22]. Обследование больных с ПОУГ с помощью анализатора глазного ответа (ORA, Reichert) показало закономерное снижение корнеального гистерезиса (КГ), т.е.

повышение жесткости роговицы, по мере прогрессирования глаукомного поражения (сравнение показателей проводилось также при компенсированном ВГД) [2, 9]. При асимметрии глаукомного процесса КГ оказывается ниже на худшем глазу [17]. Данный показатель, по всей видимости, отражает биомеханические свойства не только роговицы, но и корнеосклеральной капсулы глаза в целом [10, 14]. Это подтверждается прямыми измерениями податливости передне-экваториального отдела склеры глаукомных глаз с помощью тонометра Шиотца, которые показали повышение жесткости склеры по мере развития ПОУГ [28]. Наконец, о повышенной при глаукоме жесткости склеры неопровержимо свидетельствует ее более высокая, чем в норме, акустическая плотность [1], повышенное содержание в ее коллагеновых структурах стабилизирующих внутри- и межмолекулярных поперечных сшивок, а также более высокая концентрация нерастворимого коллагена, коррелирующая со стадией глаукомного процесса [2, 8]. Увеличение жесткости и плотности соединительнотканной оболочки глаза при ПОУГ сопровождается соответствующими изменениями и трабекулярной зоны. Методом атомной силовой микроскопии показано резкое увеличение модуля упругости трабекулы у пациентов с глаукомой [24].

Естественное старение приводит к 2-3-х-кратному утолщению корнеосклеральной трабекулы с соответствующим уменьшением площади фильтрации внутриглазной жидкости, а при развитии глаукомы, даже на ранних ее стадиях, патологическая ригидность корнеосклеральной капсулы, в целом, двукратно превышает ее инволюционные изменения [15, 16].

Повышенная плотность склеры, обусловленная, прежде всего, избыточным содержанием коллагена и поперечных сшивок в соединительнотканых структурах [8], приводит к снижению ее проницаемости, что препятствует транссклеральному движению жидкости [23], значительно увеличивает сопротивление оттоку водянистой влаги и снижает его интенсивность [25]. Таким образом, повышение плотности соединительнотканых структур глаза обуславливает снижение оттока водянистой влаги через естественные дренажные пути.

Однако остается неясным, является ли повышенная жесткость и плотность корнеосклеральной капсулы глаукомных глаз следствием глаукомного процесса или может быть одним из независимых риск-факторов его возникновения и развития. Для ответа на этот вопрос представляется целесообразным изучить связь между гидродинамикой глаза и биомеханическими свойствами корнеосклеральной оболочки.

Целью этой работы явилось экспериментальное изучение методом тонографии влияния биомеханических свойств склеры на состояние гидродинамики внутриглазной жидкости.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование, проведенное на 18 кроликах породы шиншилла, включало три основных этапа: 1) сравнительное изучение биомеханических показателей склеры и показателей гидродинамики глаз «молодых» (2-х-месячных) и «старых» (2-х-летних) интактных кроликов (1 группа); 2) оценка изменения биомеханических показателей склеры и показателей гидродинамики глаз кроликов в результате субтеноновых инъекций гликирующего

агента (раствора треозы), повышающего уровень поперечной связанности коллагена склеры (2 группа); 3) оценка изменения биомеханических показателей склеры и показателей гидродинамики глаз интактных кроликов и кроликов, получавших инъекции треозы, в результате субтеноновых инъекций протеолитического фермента коллалазина (3 группа).

Для обследования экспериментальных животных был применен комплекс специальных методов. Гидродинамические показатели оценивали методом тонографии (которая является практически единственной методикой, позволяющей неинвазивным способом *in vivo* оценить проницаемость соединительнотканых оболочек и гидродинамику внутриглазной жидкости) с помощью прибора Глаутест 60 (Россия). Определяли внутриглазное давление (P_0), коэффициент легкости оттока внутриглазной жидкости (C), уровень ее продукции (F), коэффициент Беккера (КБ) как отношение тонометрического давления к коэффициенту легкости оттока внутриглазной жидкости (P_0 / C).

Для определения уровня поперечной связанности коллагена склеры использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), позволяющий измерить термодинамические параметры денатурации коллагена (эндотермический температурный пик T_d и энтальпию ΔH_d). Возрастание температуры денатурации (T_d) принято связывать с увеличением степени сшивания коллагенового волокна [29, 31]. ДСК-термограммы получали с помощью термического анализатора модели Mettler TA 4000 с ячейкой DSC20. Образцы склеры массой 4-20 мг помещали в герметичный алюминиевый бокс и нагревали с 20 до 100°C со скоростью

сканирования 5°C/мин. Пустой бокс использовали для контроля. Энтальпию перехода рассчитывали на 1 грамм коллагена.

Для определения биомеханических показателей склеры – разрывной нагрузки P (Н), предела прочности σ (МПа), деформации ε (%) и модуля упругости E (МПа) – из нее специальным ножом с двумя режущими поверхностями вырезали стандартные образцы шириной 4,0 мм. После измерения их толщины на аппарате PosiTensor 6000 (DeFelsko, USA) проводили механические испытания на деформационной машине Autograph AGS-H, (SHIMADZU, Япония). Зависимость «напряжение-деформация», получаемая в процессе растяжения образца (скорость 1 мм/мин) вплоть до разрыва, непрерывно записывалась в цифровом и графическом режиме компьютерным блоком аппарата.

Результаты и их обсуждение

Сравнительное изучение биомеханических показателей склеры интактных 2-х-месячных и 2-х-летних кроликов (1 группа) выявило их существенные различия. Так, модуль упругости склеры молодых животных ($E=23,1\pm 4,2$ МПа) оказался в 1,8 раза ниже, чем старых ($E=41,4\pm 6,3$ МПа) ($p<0,01$). Ранее нами были подробно изучены упруго-прочностные показатели склеры глаз интактных 8-12-ти-месячных кроликов, которые служили контролем в экспериментах по укреплению склеры [6, 30]. По нашим данным, модуль упругости склеры кролика в этом возрастном периоде составляет $37,3\pm 8,4$ МПа. Сопоставление этих значений позволяет заключить, что модуль упругости склеры кролика закономерно повышается с возрастом.

Возрастное повышение жесткости склеры сопровождается увеличением уровня поперечных сшивок: температура денатурации (T_d) коллагена склеры старых животных составляет $69,5\pm 1,3^\circ\text{C}$, а для склеры молодых кроликов $T_d=67,7\pm 1,1^\circ\text{C}$ ($p<0,05$). Эти результаты полностью соответствуют известному по литературным данным возрастному увеличению модуля упругости и поперечной связанности других соединительнотканых образований организма – в частности, связок и сухожилий [20].

Измерение ВГД тонометром Маклакова (груз 10 г) не выявило значимых различий между старыми и молодыми кроликами. В то же время, сравнение гидродинамических показателей глаз кроликов в этой группе показало, что коэффициент легкости оттока у молодых животных ($C=0,19\pm 0,02$ мм³/мин/мм рт. ст.) несколько выше, чем у старых ($C=0,15\pm 0,01$ мм³/мин/мм рт.ст.). Тенденция к снижению с возрастом этого гидродинамического показателя происходит на фоне выявленного нами возрастного повышения жесткости склеры.

Во второй группе кроликов, где проводилась оценка воздействия повышенного уровня поперечной связанности склеры на ее биомеханические показатели и гидродинамику глаза, под тенонову капсулу правых (опытных) глаз инъецировали раствор известного гликирующего агента – треозы в концентрации 0,139 ммоль, левый глаз (контрольный) оставался интактным. Всего в течение 20 дней произвели 9 инъекций.

Биомеханические испытания, проведенные через 1 и 3 мес. после окончания курса инъекций треозы, показали значительные изменения упруго-прочностных показателей склеры опытных глаз по сравнению с контрольными (табл. 1).

Воздействие инъекций треозы на биомеханические показатели склеры, уровень ее поперечной связанности и гидродинамику глаза

Срок наблюдения после курса инъекций	Показатель			
	Модуль упругости E , МПа	Температура денатурации T , °C	Коэффициент легкости оттока C , мм ³ /мин/мм рт. ст.	ВГД, мм рт. ст.
1 мес.	$57,5\pm 3,1^*$	$76,6\pm 1,6^*$	$0,12\pm 0,01^*$	$18,8\pm 0,7^*$
3 мес.	$65,4\pm 6,0^*$	$77,0\pm 1,5^*$	$0,13\pm 0,03^*$	$18,8\pm 0,9^*$
контроль	$27,2\pm 3,5$	$64,3\pm 1,4$	$0,20\pm 0,02$	$17,0\pm 0,4$

* – изменение по сравнению с контролем (интактной склерой) достоверно, $p<0,05$.

В опытных глазах через 1 мес. $E=57,5\pm 3,1$ МПа, через 3 мес. величина E оставалась практически на том же повышенном уровне ($E=65,4\pm 6,0$ МПа), в то время как в контроле этот показатель был, в среднем, в 2 раза ниже и составлял $E=37,3\pm 8,4$ МПа ($p<0,01$). В соответствии с ростом модуля упругости, значимо увеличился и уровень поперечных сшивок: эндотерма денатурации коллагена в склере после инъекций треозы представляет собой два пика с максимумами $68\pm 1^\circ\text{C}$ и $73,5\pm 1^\circ\text{C}$. Тепловой эффект процесса составляет $56,5\pm 2,7$ Дж на 1 г коллагена в ткани, что соответствует ΔH_d денатурации этого белка. В среднем, в опытных глазах $T_d=71,5\pm 2,5^\circ\text{C}$, а в контрольных $T_d=64,3\pm 1,4^\circ\text{C}$ ($p<0,01$).

Повышение жесткости склеры и уровня ее поперечной связанности отразилось на состоянии гидродинамики опытных глаз. Через 1 мес. после окончания курса инъекций треозы на опытных глазах $P_0=18,8\pm 0,7$ мм рт.ст. (на парном интактном глазу $17,0\pm 0,4$ мм рт.ст.), $C=0,12\pm 0,01$ мм³/мин/мм рт. ст. (на парном глазу $0,20\pm 0,02$ мм³/мин/мм рт. ст.), $KB=144\pm 5,0$ (на парном глазу $84\pm 6,0$). Значимое ($p<0,05$) ухудшение гидродинамических показателей внутриглазной

жидкости, развившееся после субтеноновых инъекций раствора треозы, сохранялось и через 3 мес. после окончания курса этих инъекций: $P_0=18,8\pm 2,0$ мм рт.ст., $C=0,13\pm 0,07$ мм³/мин/мм рт. ст., $KB=143,8\pm 18,1$.

На 3-м этапе эксперимента, посвященном оценке воздействия протеолитического фермента (коллалазина), исследовано изменение показателей как интактных животных (группа 3а), так и животных, предварительно получавших курс субтеноновых инъекций раствора треозы (группа 3б) (табл. 2).

В группе 3а у молодых животных курс из 10 субтеноновых инъекций коллалазина (150 ед.) в правый (опытный) глаз привел через 1 мес. после его окончания к небольшому статистически незначимому снижению модуля упругости ($E=19,3\pm 4,2$ МПа) по сравнению с левым (интактным) глазом ($E=23,1\pm 4,2$ МПа). В то же время эффект снижения жесткости склеры у старых животных был более значительным: на опытных глазах $E=27,9\pm 4,9$ МПа, а на парных интактных глазах этот показатель был, в среднем, на 32,6% выше: $E=41,4\pm 6,3$ МПа ($p<0,02$).

Снижение жесткости склеры старых животных под воздействием субтено-

Таблица 2

Воздействие протеолитического фермента (коллалазина) на биомеханические показатели склеры, уровень ее поперечной связанности и гидродинамику глаз, предварительно подвергнутых воздействию треозы

Показатель	Опыт: треоза+коллалазин	Контроль: треоза
Е, МПа	43,4±4,5*	65,4±4,9
Температура денатурации Т, °С	69,5±2,5*	76,6±1,6
Р ₀ , мм рт. ст.	15,0±0,7*	19,5±2,0
С, мм ³ /мин/мм рт. ст.	0,21±0,03*	0,14±0,04
КБ	86±22,0*	145,5±7,3

* – изменение по сравнению с контролем достоверно, $p < 0,05$.

новых инъекций коллалазина сопровождалось небольшим достоверным снижением ВГД – до $P_0=15,3±0,3$ мм рт. ст. и улучшением оттока – $C=0,21±0,04$ мм³/мин/мм рт. ст. по сравнению с парным интактным глазом: $P_0=17,5±0,3$ мм рт. ст., $C=0,15±0,01$ мм³/мин/мм рт. ст. ($p < 0,05$). При этом значения ВГД и С глаз молодых кроликов под воздействием инъекций коллалазина практически не изменились.

В группе 3б, где через 1 мес. после курса субтеноновых инъекций треозы в оба глаза провели 10 субтеноновых инъекции коллалазина в правые глаза (опытная группа), биомеханические испытания, выполненные через 1 мес. после окончания курса протеолитической терапии, выявили достоверное снижение жесткости склеры по сравнению с левыми глазами (контрольная группа, где был проведен только курс инъекций треозы). Модуль упругости склеры опытных глаз снизился до $43,4±4,5$ МПа и приблизился к среднему уровню нормы ($37,3±8,4$ МПа), в то время как величина Е у парных глаз после воздействия треозы оставалась высокой ($65,4±4,9$ МПа) ($p < 0,02$). В среднем, снижение жесткости склеры,

предварительно подвергнутой воздействию треозы, в результате протеолитической терапии составило 33,6%. При этом после действия коллагенолитического фермента эндотерма денатурации меняется – высокотемпературный пик исчезает или превращается в плечо, при этом температура денатурации основной фракции снижается. Важно, что тепловой эффект денатурации сохраняется $\Delta H_D = 58,8±3,3$.

Снижение жесткости склеры сопровождалось достоверным ($p < 0,05$) снижением величины ВГД и улучшением гидродинамических показателей: в опытной группе глаз P_0 составило $15,0±0,7$ мм рт. ст. (на парных глазах $P_0=19,5±2,0$ мм рт. ст.), $C=0,21±0,06$ мм³/мин/мм рт. ст. (на парных глазах $C=0,14±0,04$ мм³/мин/мм рт. ст.), $КБ=86±22,0$ (на парных глазах $КБ=145,5±7,3$).

Полученные нами экспериментальные данные, касающиеся модуля упругости склеры глаз кроликов и коэффициента легкости оттока внутриглазной жидкости, совместно с данными ДСК показывают, что при увеличении жесткости склеральной ткани происходит снижение оттока внутриглазной жид-

кости. При этом коллалазин способен снижать плотность склеральной ткани и, как следствие, повышать коэффициент легкости оттока, вероятно, за счет снижения уровня поперечных сшивок, полученных в результате гликации, возникающих, в том числе, в процессе естественного старения.

Известно, что у пациентов с ПОУГ происходит патологическое ускорение естественных геронтологических процессов изменения эластичности и упругости фиброзных оболочек глаза [3]. Возможно, укрепление тканевого матрикса глаукомной склеры в большей степени вызвано усилением процессов сшивания трансклутаминой ферментом, активация которого является проявлением апоптоза [29], и ослаблением действия коллагенолитических ферментов. В результате скорость деградации тканевых структур снижается по сравнению со скоростью синтеза.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) позволяет получить эндотерму денатурации коллагена, представленную четким пиком, отражающим конформационный переход спираль-клубок и более или менее выраженным высокотемпературным плечом, показывающим наличие фракции коллагена, сшитой поперечными связями по механизму неферментативной гликации, которые формируются во время старения (плечо не выражено у пациентов моложе 15 лет) [6, 7]. Воздействие треозы приводит к возрастанию уровня поперечных сшивок коллагена, полученных в результате гликации, об этом свидетельствуют данные ДСК. Результаты ДСК склеры кроликов, предварительно подвергнутой воздействию треозы, после инъекций коллалазина свидетельствуют о том, что макромолекулы коллагена сохраняют на-

тивную трехспиральную конформацию. Снижение основного пика денатурации и исчезновение высокотемпературного плеча однозначно указывает на уменьшение стабилизирующих сшивок, особенно образовавшихся в результате гликации. Возможно, преимущественный протеолиз гликированного коллагена связан с искажением квазикристаллической фибриллярной упаковки коллагена при гликации. Это приводит к облегчению образования фермент-субстратного комплекса и к последующей деградации гликированной фракции.

В настоящее время при лечении пациентов с ПОУГ для компенсации ВГД широкое распространение получили аналоги простагландинов. Усиление увеосклерального оттока при лечении простагландинами связано с разрежением тканевого матрикса ресничной мышцы [23]. Взаимодействуя со специфическими рецепторами, простагландины F_{2a} вызывают усиление секреции металлопротеиназы (ММП) в тканях цилиарной мышцы. ММП могут разрушать фибриллы коллагена, в результате чего происходит разрежение матрикса. Это способствует уменьшению гидравлической резистентности путей увеосклерального оттока и снижению ВГД. Кроме того, в эксперименте показано, что перфузия трабекулярной зоны металлопротеиназами в десятки раз снижает сопротивление оттоку внутриглазной жидкости [25].

В проведенной нами работе экспериментально доказано, что коллалазин (коллагеназа, полученная из *Clostridium histoliticum*) способен снижать плотность и разрезать матрикс склеральной ткани, подвергнутой процессам естественного старения и гликации. В связи с этим, мы считаем целесообразным в дальнейшем клинически изучить возможность воз-

действия на соединительнотканную капсулу глаза пациентов с ПОУГ протеолитическими ферментами (коллагеназами) для снижения жесткости и увеличения ее проницаемости с целью профилактики развития глаукомного поражения.

Выводы.

Полученные экспериментальные результаты показывают, что биомеханические свойства склеры оказывают влияние на гидродинамику глаза: при повышении жесткости склеры за счет избыточного формирования поперечных связей (сшивок) в ее коллагеновых структурах отток внутриглазной жидкости снижается, что может быть фактором развития ПОУГ. Протеолитическая терапия с помощью коллагиназы дает возможность снизить число таких сшивок, уменьшить жесткость склеры и улучшить гидродинамические показатели глаза. Таким образом, ферментативная регуляция биомеханических свойств склеры (снижение ее жесткости), по всей видимости, является новым перспективным направлением в терапии глаукомного поражения.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 12-02-00622-а).

Список литературы

1. **Акопян А.И., Еричев В.П., Иомдина Е.Н.** Ценность биомеханических параметров глаза в трактовке развития глаукомы, миопии и сочетанной патологии // Глаукома. 2008. № 1. С. 9-14.
2. **Арутюнян Л.Л.** Роль вязко-эластических свойств глаза в определении давления цели и оценке развития глаукоматозного процесса // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 2009. 24 с.
3. **Вит В.В.** Строение зрительной системы человека. М. 2003. 727 с.

4. **Волков В.В.** Глаукома открытоугольная. М. 2008. 348 с.
5. **Данилов Н.А.** Состояние коллагена в тканях глаза и его целенаправленная модификация // Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М. 2011. 24 с.
6. **Данилов Н.А., Игнатъева Н.Ю., Иомдина Е.Н., Гроховская Т.Е., Обрезкова М.В., Руденская Г.Н., Лукин В.В.** Увеличение стабильности склерального коллагена в в ходе гликозилирования трезой *in vitro* // Журнал физ. химии. 2010. т. 84. № 1. С. 131-137.
7. **Игнатъева Н.Ю.** Термическая стабильность коллагена в соединительных тканях // Автореф. дис. ... докт. хим. наук. М. 2011. 51 с.
8. **Иомдина Е.Н., Арутюнян Л.Л., Игнатъева Н.Ю. и др.** Структурно-биомеханические особенности склеры у больных с разными стадиями ПОУГ // Сб. конф. «Рос. общенациональный офтальмол. форум». М. 2008. С. 540-544.
9. **Иомдина Е.Н., Арутюнян Л.Л., Катаргина Л.А. и др.** Взаимосвязь корнеального гистерезиса и структурно-функциональных параметров зрительного нерва при разных стадиях первичной открытоугольной глаукомы // Рос. офтальмол. журн. 2009. № 3. С. 17-23.
10. **Иомдина Е.Н., Игнатъева Н.Ю., Данилов Н.А. и др.** Биомеханика корнеосклеральной оболочки глаза при миопии и глаукоме: сходство и различия // «Биомеханика глаза 2009». М. 2009. С. 110-114.
11. **Кошиц И.Н., Светлова О.В., Котляр К.Е. и др.** Биомеханический анализ традиционных и современных представлений о патогенезе первичной открытоугольной глаукомы // Глаукома. 2005. № 1. С. 41-62.
12. **Нестеров А.П.** Глаукома: основные проблемы, новые возможности //

Вестн. офтальмол. 2008. № 1. С. 3-5.

13. Офтальмология: национальное руководство / под ред. С.Э.Аветисова, Е.А. Егорова, Л.К. Мошетовой, В.В. Нероева, Х.П. Тахчиди. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2011. 944 с.

14. **Светлова О.В., Балашевич Л.И., Засеева М.В. и др.** Физиологическая роль ригидности склеры в формировании уровня внутриглазного давления в норме и при глаукоме // Глаукома. 2010. № 1. С. 26-40.

15. **Страхов В.В., Алексеев В.В.** Динамическая ригидометрия // Вестн. офтальмол. 1995. Т. 111. № 1. С. 18-20.

16. **Страхов В.В., Алексеев В.В.** Патогенез первичной глаукомы - все или ничего // Глаукома. 2009. № 2. С. 40-52.

17. **Anand A., De Moraes C., Teng C. et al.** Hysteresis and Visual Field Asymmetry in Open Angle Glaucoma // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010. V. 51. N. 12. P. 6514-6518.

18. **Burgoyne C.F., Downs J.C., Bellezza A.J. et al.** The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage // Prog Retin Eye Res. 2005. V. 24. P. 39-73.

19. **Ethier C.R.** Scleral biomechanics and glaucoma - a connection? // Can J Ophthalmol. 2006. V. 41. P. 9-12.

20. **Fratzl P.** Collagen. Structure and mechanics. Potsdam. Springer. 2008. 506 p.

21. **Gottanka J., Johnson D.** Severity of optic nerve damage in eyes with POAG is correlated with changes in the trabecular meshwork // J. Glaucoma. 1997. V. 6. P. 123-132.

22. **Hommer A., Fuchsjaeger-Mayrl G., Resch H. et al.** Estimation of Ocular Rigidity Based on Measurement of Pulse

Amplitude Using Pneumotometry and Fundus Pulse Using Laser Interferometry in Glaucoma // IOVS. 2008. V. 49. P. 4046-4050.

23. **Kim J., Lindsey J., Wang N.** Increased Human Scleral Permeability with Prostaglandin Exposure // IOVS. 2001. V. 42. N 7. P. 1514-1521.

24. **Last J., Pan T., Ding Y.** Elastic Modulus Determination of Normal and Glaucomatous Human Trabecular Meshwork // IOVS. 2011. P. 10-6342

25. **Lindsey J.D., Kashivagi K., Kashivagi F., Weinreb R.N.** Prostaglandin action on ciliary smooth muscle extracellular matrix metabolism: implication for uveoscleral outflow // Surv Ophthalmol. 1997. V. 41. (suppl 2). P. 53-59.

26. **Quigley H. A., Broman A.T.** The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 // Br. J. Ophthalmol. 2006. Vol. 90. № 3. P. 262-267.

27. **Sigal I.A., Flanagan J.G., Ethier C.R.** Factors influencing optic nerve head biomechanics. // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005. V. 46. P. 4189-4199.

28. **Sullivan-Mee M., Pensyl D., Halverson K. et al.** Rigidity in Primary Open-Angle Glaucoma // ARVO 2010, Suppl. E. Poster 5548.

29. **Wodzinska J. M.** // Mini Rev. Med. Chem. 2005. V. 5. P. 279-292.

30. **Wollensak G., Iomdina E.** Long-term biomechanical properties after collagen crosslinking of sclera using glycerinaldehyde // Acta Ophthalmol. Scand. 2008. Vol. 86. Issue 8. P. 887-893.

31. **Zeeman R.** Cross-linking of collagen-based materials. Thesis University of Twente, Enschede, The Netherlands. 1998.

The impact of biomechanical properties of the corneoscleral shell on eye hydrodynamics (an experimental study)

E.N. Iomdina, O.A. Kiseleva, L.A. Nazarenko, N.Yu. Ignatieva,
V.N. Bagratashvili

It is hypothesized that impaired biomechanical properties of the sclera around the optic disc and, largely, in the corneoscleral shell may play an essential role in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma (POAG). The paper's objective is to study experimentally the impact of elastic scleral properties on intraocular fluid (IF) outflow. We determined the mechanical characteristics and the crosslinking level of the sclera as well as hydrodynamic parameters in three groups of experimental animals: 1) intact eyes of young (2 months of age) and old (2 years) rabbits; 2) eyes treated in vivo by threose, which increases crosslinking of scleral collagen; 3a) eyes of young and old rabbits after they were treated by collalysin, a proteolytic enzyme, 3b) eyes of rabbits pre-treated by threose and subsequently treated by collalysin. The hydrodynamic parameters were measured using Glautest 60. Differential scanning calorimetry was used to reveal the crosslinking level of scleral collagen. The biomechanical parameters of sclera were determined by Autograph AGS-H. The normal age-related increase of scleral stiffness (Young's modulus) from 23.1 ± 4.2 MPa to 41.4 ± 6.3 MPa ($p < 0.05$) is followed by a moderate growth of cross links and a somewhat reduced IF outflow. At the same time, an increase of scleral stiffness (to 65.4 ± 6.0 MPa) caused by threose, i.e. a pathological growth of crosslinking, is accompanied by a certain intraocular pressure increase and a significant impairment of IF outflow. Collalysin-treated old rabbits revealed a fall in scleral stiffness (to 27.9 ± 4.9 MPa) and an improved IF hydrodynamics, whereas young animals showed only a slight change in these parameters. The sclera treated by threose and containing excessive cross links also became less stiff (43.4 ± 4.5 MPa) and improved IF hydrodynamics after collalysin treatment. It may be assumed that the biomechanical properties of sclera affect the eye hydrodynamics: IF outflow is deteriorating with the increase of scleral stiffness that is caused by excessively generated cross links in its collagen structures, which may be a risk factor for POAG. Proteolytic therapy with collalysin helps reduce the amount of these links, make the sclera less stiff and improve hydrodynamic parameters of the eye.

Key words: sclera, intraocular fluid, collagen, crosslinking, elasticity modulus.

Изучение изотопных эффектов тяжелой воды (D_2O) в биологических системах на примере клеток прокариот и эукариот

О.В. Мосин¹, И. Игнатов²

¹ – Московский государственный университет пищевых производств, Москва

² – Научно-исследовательский центр медицинской биофизики НИЦ МБ, София, Болгария

Контактная информация: доктор наук Европейской академии естествознания
Игнатов Игнат mbioph@dir.bg

Изучены изотопные эффекты дейтерия (D) в клетках различных таксономических групп прокариотических и эукариотических микроорганизмов, реализующих митолотрофные, хемогетеротрофные, фотоорганогетеротрофные и фотосинтетические способы ассимиляции углеродных субстратов при росте на средах с тяжелой водой (D_2O). Разработан метод ступенчатой адаптации клеток к D_2O , заключающийся в их рассеве на чашках Петри с твердыми (2% агар) питательными средами при ступенчатом увеличении градиента концентрации D_2O (от 0 до 98% D_2O) и последующей селекции устойчивых к D_2O клеток. В результате этой техники на максимально дейтерированной среде с 98% D_2O получены адаптированные к D_2O клетки, биологический материал которых вместо атомов водорода содержит атомы дейтерия с уровнем дейтерированности молекул 92-97,5% D. Использование адаптированных к D_2O клеток и выделенных из них дейтерированных природных соединений (белки, аминокислоты, нуклеозиды, пигменты, углеводы, липиды) может найти дальнейшее применение в биофизических исследованиях и биомедицинских технологиях.

Ключевые слова: дейтерий, тяжелая вода, изотопные эффекты, адаптация, бактерии, микроводоросли.

Введение

Одним из интереснейших биологических феноменов является способность некоторых микроорганизмов расти в искусственных условиях в тяжелой воде (D_2O) [8]. D_2O обладает высоким экологическим потенциалом вследствие отсутствия радиоактивности, что способствует ее использованию в качестве изотопного индикатора в химии, биологии и медицине [18]. В природных водах соотношение D/H составляет 1:5500 (в предположении, что весь дейтерий находится в форме D_2O) [20]. В действительности дейтерий присутствует в форме D_2O лишь в концентрированных растворах. При небольших концентрациях в воде он

присутствует в форме HDO, поскольку в смесях D_2O - H_2O с большой скоростью происходят реакции диссоциации и изотопного (H-D) обмена, приводящие к образованию HDO.

Изотопные эффекты, опосредованные разницей нуклеарных масс дейтерия и протия пары H/D, могут быть достаточно большими [4]. Химические реакции в D_2O протекают с более медленной скоростью, чем в H_2O , D_2O слабее ионизирована, чем H_2O , константа диссоциации D_2O меньше таковой для H_2O , растворимость органических и неорганических веществ в D_2O , как правило, ниже, чем в H_2O , водородные связи с участием дейтерия несколько прочнее обычных, подвижность

ионов D_3O^+ на 28,5% ниже H_3O^+ , а OD^- – на 39,8% ниже OH^- [24]. Для других ионов различие подвижностей в H_2O и D_2O составляет около 18% [3]. Константы диссоциации слабых кислот и оснований K_a снижаются в D_2O по сравнению с H_2O , а растворимость и растворяющая способность D_2O для многих неорганических и органических веществ, как правило, ниже, чем у H_2O , хотя известны и обратные факты.

Систематическое изучение воздействия D_2O на клетки животных, растений и микроорганизмов в нашей стране начато сравнительно недавно [1]. Эксперименты показали, что D_2O действует негативно на жизненные функции организмов, замедляет клеточный метаболизм и ингибирует митоз в стадии профазы; это происходит даже при использовании обычной природной воды с повышенным содержанием D_2O или HDO [14]. Клетки животных способны выдерживать до 30% D_2O , растений – 50% D_2O , микроводорослей – 70% D_2O , а клетки простейших и микроорганизмов – 95% D_2O [9].

С развитием новых биотехнологических подходов появилась возможность использовать в качестве биомоделей для научных целей и прикладных исследований, в т.ч. для направленного синтеза D-меченных природных соединений, адаптированные к D_2O клетки микроорганизмов и микроводорослей. Традиционным методом при этом является выращивание микроорганизмов в средах, содержащих максимальные концентрации D_2O и дейтерированных субстратов, – например, [D]метанол [10]. В процессе роста клеток в D_2O в них синтезируются молекулы биологически важных природных соединений (ДНК, белки, аминокислоты, нуклеозиды, пигменты, углеводы,

липиды), атомы водорода при углеродных скелетах которых полностью замещены на дейтерий. Их выделяют из дейтерированной биомассы, полученной на средах с высокими концентрациями D_2O и дейтерированными субстратами, используя комбинацию физико-химических методов выделения – гидролиз, осаждение и экстракцию органическими растворителями и хроматографическую очистку методом колоночной хроматографии с применением различных сорбентов. Такие дейтерированные молекулы претерпевают структурно-адаптационные модификации, необходимые для нормального функционирования клетки в D_2O .

Биологическая адаптация к D_2O интересна не только с научной точки зрения, но она также позволяет получать уникальный дейтерированный биологический материал для диагностических биомедицинских целей, а также решения задач молекулярной организации клетки методом ЯМР-спектроскопии [17]. Тенденции к применению дейтерия в качестве изотопной метки обусловлены отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации дейтерия в молекуле методами высокого разрешения: спектроскопией ЯМР [19], ИК-спектроскопией [21] и масс-спектрометрией [11]. Это позволило за последние годы существенно повысить эффективность проведения многочисленных биомедицинских исследований с D_2O и дейтерированными природными соединениями *de novo*, а также изучать структуру и механизм их действия на молекулярном уровне.

Данная работа является продолжением наших исследований, связанных с принципиальной возможностью практического использования различных кле-

ток бактерий, микроводорослей и растений, для синтеза D-меченных природных соединений в условиях максимально дейтерированных сред с D_2O . Целью работы являлось изучение изотопных эффектов D_2O в клетках различных таксономических групп микроорганизмов и микроводорослей, осуществляющих метилотрофный, хемогетеротрофный, фотоорганогетеротрофный и фотосинтетический пути ассимиляции углеродных субстратов.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись две хемогетеротрофные грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* и *Brevibacterium methylicum* (последняя способна к метилотрофии), фотоорганогетеротрофная галобактерия *Halobacterium halobium* и фотосинтезирующая одноклеточная зеленая микроводоросль *Chlorella vulgaris*, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов ГосНИИГенетика.

1. *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В 5652, лейцинзависимый штамм грамположительных факультативных метилотрофных бактерий, ассимилирующий метанол по РМФ-циклу фиксации углерода.

2. *Bacillus subtilis* В-3157, полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу штамм грамположительных хемогетеротрофных бактерий, релизующий гексозо-6-моно-фосфатный (ГМФ) путь ассимиляции углеводов.

3. *Halobacterium halobium* ET 1001, фотоорганогетеротрофный каротиноид-

содержащий штамм экстремальных галобактерий, синтезирующий трансмембранный белок бактериородопсин.

4. *Chlorella vulgaris* В 8765, зеленая одноклеточная фотосинтезирующая микроводоросль.

Для приготовления питательных сред применяли D_2O (99,8 ат.% D), DCl (95,5 ат.% D) и [D]метанол (97,5 ат.% D), полученные из Российского научно-исследовательского центра «Изотоп» (Санкт-Петербург, РФ). Неорганические соли и D, L- глюкозу (Reanal, Венгрия) предварительно перекристаллизовывали в D_2O , D_2O дистиллировали в присутствии $KMnO_4$ с последующим контролем изотопной чистоты 1H ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) (рабочая частота 70 МГц, внутренний стандарт Me_4Si).

Для выращивания использовали следующие питательные среды (количества компонентов приведены в г/л):

1. Минимальная среда М9 для выращивания факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum*, на основе ступенчато-увеличивающихся концентраций D_2O (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98 об.%* D_2O) и 2% метанолом/[D]метанолом (г/л): KH_2PO_4 3; Na_2HPO_4 6; NaCl 0,5; NH_4Cl 1.

2. Среда ГС1 для выращивания хемогетеротрофной бактерии *B. subtilis* (на основе 99,8% D_2O): глюкоза 120; гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* 25; NH_4NO_3 30; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20; $CaCO_3$ 20.

3. Среда ГС2 для выращивания фотоорганогетеротрофной галобактерии *H. halobium* (на основе 99,8% D_2O): NaCl 250; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20; KCl 2; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,065; цитрат натрия 0,5; гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum* 20, витами-

* Здесь и далее использованы проценты по объему, об.%

ны (биотин – $1 \cdot 10^{-4}$; фолиевая кислота – $1,5 \cdot 10^{-4}$; витамин B_{12} – $2 \cdot 10^{-5}$).

4. Среда Тамия для выращивания фотосинтезирующей зеленой микроводоросли *C. vulgaris* (на основе 99,8% D_2O): KNO_3 – 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2,5; KH_2PO_4 – 1,25; $FeSO_4$ – 0,003; микроэлементы ($MnSO_4 \cdot 2H_2O$ – $3 \cdot 10^{-4}$; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,065; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – $4 \cdot 10^{-5}$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – $5 \cdot 10^{-5}$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – $5 \cdot 10^{-6}$).

Стартовым материалом для выращивания хемогетеротрофных бактерий и галобактерий являлась дейтеро-биомасса факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum*, полученная в условиях многоступенчатой адаптации на твердых (2% агар) средах М9 с D_2O . Полученную дейтеро-биомассу *B. methylicum* (выход 100 г по влажному весу с 1 л среды) автоклавировали в 0,5 н. HCl (в D_2O) (0,8 атм, 30 мин), нейтрализовали 0,1 н. KOH (в D_2O) (рН 7,0) и использовали в качестве источника дейтерированных ростовых субстратов для адаптации и выращивания хемоорганогетеротрофных бактерий *B. subtilis* и галобактерий *H. halobium*.

Выращивание грамположительных бактерий *B. subtilis* проводили на ГС1 среде при 34°C в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с наполнением средой до 50 мл в условиях интенсивной аэрации на орбитальном шейкере *Biorad* (100 об/мин) (Польша), используя в качестве источников дейтерированных субстратов D_2O и гидролизат дейтеро-биомассы *B. methylicum*. Галобактерии *H. halobium* выращивали в аналогичных условиях на ГС2 среде при 37°C при освещении лампами дневного света ЛБ-40. Выращивание микроводоросли *C. vulgaris* проводили на синтетической среде Тамия при 32°C в фотореакторе с барботажем CO_2 . Рост оценивали по способности к образованию отдельных колоний на по-

верхности твердых агаризованных сред с D_2O , а также по величине ОП суспензии клеток, измеренной на спектрофотометре Beckman-DU6 (США) при $\lambda=620$ нм. После 6-7 суток культивирования клетки отделяли центрифугированием (10000 об/мин, 20 мин) на центрифуге Т-24 (ФРГ). Биомассу промывали D_2O и экстрагировали смесью органических растворителей хлороформ-метанол-ацетон (2:1:1) для отделения липидов и пигментов. Полученный осадок высушивали до постоянной массы (10-12 мг) и использовали в качестве фракции суммарных белков биомассы, а жидкий экстракт – в качестве липидной фракции. [D]рибоксин выделяли из КЖ *B. subtilis* адсорбцией активированным углем (12 ч, 4°C), экстракцией 0,3 М NH_4 -формиатным буфером (рН 8,9) и перекристаллизацией в 80% этаноле ($[\alpha]D_2O = +1,61^\circ$, выход 3,1 г/л (80%)). БР выделяли из фракции пурпурных мембран *H. halobium* по методу Остерхельта, усовершенствованному нами [22].

Гидролиз дейтерированных белков биомассы проводили при 110°C в течение 24 ч в запаянных стеклянных ампулах в 50-ти-кратном избытке 6 н. DCl (в D_2O), используя 10 мг сухой дейтеро-биомассы. Реакционную массу суспендировали в горячей D_2O , фильтровали. Гидролизат упаривали в роторном испарителе РВО-64 (Венгрия) при 60°C. Остатки DCl удаляли в эксикаторе путем выдерживания над твердым NaOH. Для проведения гидролиза внутриклеточных углеводов 50 мг сухой делипидизованной дейтеро-биомассы помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл D_2O и 1,6 мл 25% H_2SO_4 и кипятили с обратным водяным холодильником в течение 90 мин. По охлаждении реакционную смесь суспендировали в 50 мл D_2O и ней-

трализовали 2 н. раствором $Ba(OH)_2$ (в D_2O) до рН 7,0. Выпавший осадок $BaSO_4$ отделяли центрифугированием (15000 об/мин, 5 мин), супернатант декантировали и упаривали в роторном испарителе при 60°C.

Аминокислотный анализ белковых гидролизатов проводили на приборе Biotronic LC 5001 (ФРГ); 230x3,2 мм; рабочее давление 50-60 атм; скорость подачи Na-цитратного буфера 18,5, нингидрина – 9,25 мл/ч; детекция при $\lambda=570$ нм и $\lambda=440$ нм (для пролина).

Анализ углеводов осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer (ФРГ), снабженным насосом Gilson (ФРГ) и рефрактометром Waters K 401 (ФРГ); неподвижная фаза: Separon NH_2 , 10 мкм; подвижная фаза: CH_3CN-H_2O , (75:25); скорость подачи 0,6 мл/мин.

Липиды анализировали на хроматографе Beckman Gold System (США), снабженным насосом Model 166 и детектором Model 126 (США); неподвижная фаза: Ultrasphere ODS 5 мкм; 4,6 x 250 мм; подвижная фаза: линейный градиент 5 мМ $KH_2PO_4-CH_3CN$; 100% в течение 50 мин; скорость подачи – 0,5 мл/мин; детекция при $\lambda=210$ нм.

Масс-спектры FAB регистрировали на импульсном масс-спектрометре VG-70 SEQ (Fisons, VG Analytical, США) с цезиевым источником Cs^+ на глицериновой матрице с ускоряющим напряжением 5 кВ и ионным током 0,6-0,8 мА. Уровни включения дейтерия в молекулы аминокислот белковых гидролизатов определяли методом масс-спектрометрии ЭУ в виде метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот на приборе MB-80A (Hitachi, Япония) при ионизирующем напряжении 70 эВ и температуре катодного источника 180-200°C

по ранее разработанной нами методике [12]. Расчет уровней дейтерированности молекул проводили по соотношению вкладов пиков молекулярных ионов $[M]^+$ дейтерированных соединений, выделенных с D_2O -средах и контроля, полученного в H_2O -среде.

Результаты и их обсуждение

При воздействии воды на биологические объекты их реакция изменяется в зависимости от изотопного состава воды и величины изотопных эффектов, определяемых разницей констант скоростей химических реакций kh/kd . в H_2O и D_2O . Самые большие изотопные эффекты с соотношением $kh/kd = 6-8$ наблюдаются в D_2O для C-H/C-D, N-H/N-D и O-H/O-D связей. Изотопные эффекты оказывают влияние не только на физико-химические свойства, но и на биологические свойства D_2O . Эксперименты с D_2O показали (рис. 1), что микроводоросли способны расти на 70% D_2O , метилотрофные бактерии – 75% D_2O , хемогетеротрофные бактерии – 82% D_2O , а галофилы – 95% D_2O .

В ходе эксперимента были получены адаптированные к максимальным концентрациям D_2O клетки относящихся к различным таксономическим группам микроорганизмов, реализующих метилотрофный, хемогетеротрофный, фотоорганогетеротрофный и фотосинтетический пути ассимиляции углеродных субстратов, – факультативные метилотрофные бактерии *B. methylicum*, хемогетеротрофные бактерии *B. subtilis*, галобактерии *H. halobium* и микроводоросли *C. vulgaris*.

Выбор ассимилирующих метанол факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum* был связан с разработкой новых биотехнологий получения метилотрофной дейтеро-биомассы на [D]ме-

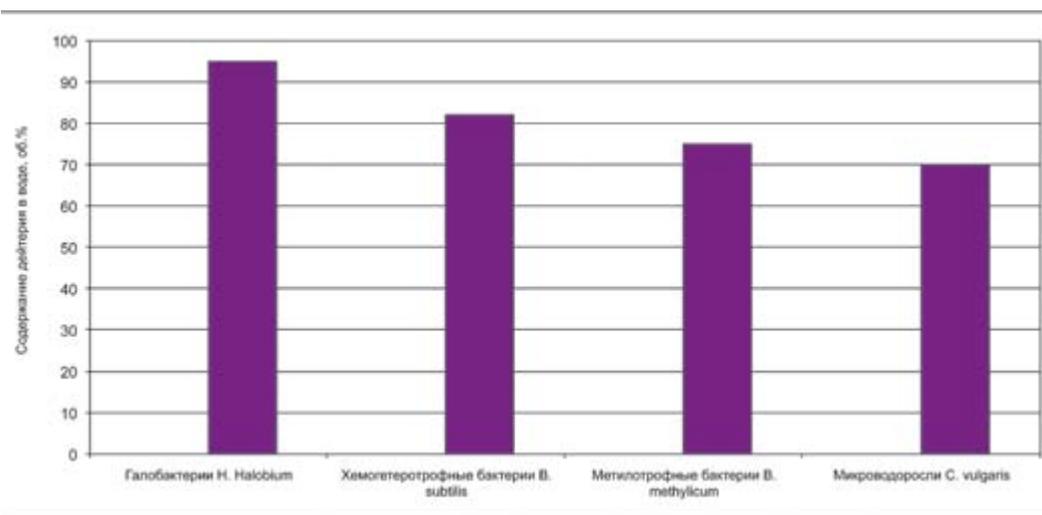


Рис. 1. Выживаемость клеток изученных микроорганизмов в воде с различными содержаниями дейтерия.

танолу и D₂O и ее дальнейшего использования как источника дейтерированных ростовых субстратов для выращивания других штаммов-продуцентов.

Выбор фотоорганогетеротрофных галобактерий *H. halobium* был обусловлен перспективами дальнейшего выделения ретинальсодержащего трансмембранного белка бактериородопсина (БР) – хромопротеида из 248 аминокислотных остатков, содержащего в качестве хромоформной группы эквимолекулярную смесь 13-цис- и полностью 13-транс-ретинольного C₂₀-каротиноида, связанного с остатком Lys-216 и определяющего пурпурно-красный цвет галобактерий [5]. БР выполняет в клетках галобактерий роль АТФ-зависимой транслоказы, создающей электрохимический градиент протонов H⁺ на поверхности клеточной мембраны, энергия которого используется клеткой для синтеза АТФ в анаэробном фотосинтетическом фосфорилировании.

Использование хемогетеротрофных бактерий *B. subtilis* определялось необходимостью препаративного выделения

производимого этой бактерией дейтерированного рибонуклеозида – рибоксина (уровень дейтерированности 62,5% D) для медицинской диагностики, а использование фотосинтезирующей микроводоросли *C. vulgaris* было связано с исследованием биосинтеза в D₂O дейтерированных хлорофилловых и каротиноидных пигментов (уровень дейтерированности 95-97% D) для их последующего использования для реконструкции искусственных мембран.

Для адаптации клеток к D₂O использовали ступенчато увеличивающийся градиент концентрации D₂O, поскольку предполагалось, что постепенное привыкание организма к дейтерию будет оказывать благоприятный эффект на ростовые и физиологические параметры. Стратегия адаптации к D₂O показана в табл. 1 на примере метилотрофных бактерий *B. methylicum*, дейтеро-биомасса которых использовалась в дальнейших экспериментах в качестве D-меченных ростовых субстратов для выращивания хемогетеротрофных и фотоорганогетеротрофных бактерий.

Изотопный состав ростовых сред и характеристики роста метилотрофных бактерий *B. methylicum* в процессе адаптации к D₂O

Номер опыта	Компоненты среды, об. %				Лag-период, ч	Выход микробной биомассы, % от контроля	Время генерации, ч
	H ₂ O	D ₂ O	метанол	[D] метанол			
1	98,0	0	2	0	20	100	2,2
2	98,0	0	0	2	30	92,3	2,4
3	73,5	24,5	2	0	32	90,6	2,4
4	73,5	24,5	0	2	34	85,9	2,6
5	49,0	49,0	2	0	40	70,1	3,0
6	49,0	49,0	0	2	44	60,5	3,2
7	24,5	73,5	2	0	45	56,4	3,5
8	24,5	73,5	0	2	49	47,2	3,8
9	0	98,0	2	0	58	32,9	4,4
10	0	98,0	0	2	60	30,1	4,9
10'	0	98,0	0	2	40	87,0	2,8

Примечание: Данные опытов 1-10 приведены при выращивании бактерий в минимальных средах M9, содержащих 2% метанол/[D]-метанол и указанные концентрации D₂O. Данные опыта 10' приведены для адаптированных к максимальному содержанию дейтерия в среде бактерий при выращивании в среде с максимальными концентрациями D₂O. В качестве контроля использовали опыт 1, где применяли обычную воду и метанол.

Стратегия адаптации к D₂O заключалась в рассеве исходных клеток микроорганизмов на чашках Петри с твердыми агаризованными средами с 2%-м агаром при ступенчатом увеличении концентрации D₂O в них (от 0; 24,5; 49,0; 73,5 до 98% D₂O) и последующей селекции устойчивых к D₂O клеток. Выросшие на средах с низким градиентом концентрации D₂O клетки переносили на среды с большим градиентом концентрации, вплоть до 98% D₂O. На конечном этапе на максимально дейтерированной среде с 98% D₂O были выделены отдельные клеточные колонии, представляющие собой потомство одной единственной клетки, устойчивой к действию D₂O. Затем колонии переносили в жидкие питательные

среды такого же состава, приготовленные на основе D₂O, и культивировали в течение 5 сут при 34°C. Уровень выживаемости клеток на полностью дейтерированной среде составил не более 40-50%. За ходом адаптации наблюдали по изменениям продолжительности лag-периода, времени клеточной генерации и выходов микробной биомассы, а также по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных сред с D₂O и подсчету клеток.

Все адаптированные к D₂O клетки сохранили способность размножаться в D₂O-средах, а также биосинтетические способности к синтезу аминокислот, белков и нуклеозидов. Общей особенностью адаптированных к D₂O клеток микроор-

ганизмов при росте в D₂O-средах было увеличение лаг-периода и времени клеточной генерации при уменьшении выходов микробной биомассы. Значения этих параметров коррелировали с уровнями содержания D₂O в ростовых средах, с фиксированием самых низких значений в максимально дейтерированной среде (опыты 9, 10, табл. 1). В отличие от адаптированных к D₂O микроорганизмов, рост исходных микроорганизмов в максимально дейтерированных средах с D₂O ингибировался дейтерием. Выходы биомассы в максимально дейтерированных средах составили 85-90% для разных таксономических групп микроорганизмов. Адаптированные микроорганизмы имели несколько сниженные уровни накопления микробной биомассы и увеличенные времена клеточной генерации при росте в D₂O-средах.

Полученный результат в опытах по адаптации метилотрофных бактерий *B. methylicum* к D₂O позволил использовать гидролизаты метилотрофной дейтеробиомассы, полученной в процессе многоступенчатой адаптации к D₂O, в качестве дейтерированных ростовых субстратов для выращивания хемогетеротрофных бактерий *B. subtilis* и фотоорганогетеротрофных галобактерий *H. halobium*. Усваиваемость биомассы метилотрофов клетками простейших и эукариот составляет 85-99%, а производительность метилотрофов, измеренная по уровню конверсии метилового спирта, достигает 50-60% [23]. При разработке питательных сред на основе дейтеро-биомассы метилотрофных бактерий учитывалось, что метилотрофные бактерии при росте на метаноле способны синтезировать большое количество полноценных белков (до 55% от веса сухого вещества), 15-17% полисахаридов, 10-12% липидов (в основном, фосфолипидов) и 18% золь-

ных веществ [13]. Причем эта способность сохраняется при росте на средах, содержащих D₂O и [D]метанол. Чтобы обеспечить высокие выходы этих соединений и минимизировать реакции обратного изотопного (H-D) обмена в аминокислотных остатках молекул белков, гидролиз дейтеро-биомассы проводили автоклавированием в 0,5 н. DCl (в D₂O).

Учитывая способы ассимиляции углеродных субстратов, адаптацию хемогетеротрофных *B. subtilis* и галобактерий *H. halobium* проводили путем посева исходных бактерий до отдельных колоний на соответствующих твердых (2% агар) питательных GC1 и GC2 средах на основе 99,8% D₂O и гидролизата дейтеро-биомассы *B. methylicum* и последующей селекцией колоний по признаку устойчивости к D₂O. В отличие от D₂O, D-субстраты из гидролизата дейтеробиомассы не оказывали существенного влияния на параметры роста исследуемых микроорганизмов. Выход [D]рибозина, зафиксированный при росте *B. subtilis* на максимально дейтерированной GC 1 среде, составил 3,9 г/л при уровне ассимиляции глюкозы из КЖ 40 г/л. Фракционирование [D]рибозина из КЖ штамма продуцента производили адсорбцией/десорбцией на поверхности активированного угля, экстракцией 0,3 М NH₄-формиатным буфером (pH 8,9) с последующей перекристаллизацией в 80% этаноле и колоночной ионообменной хроматографии на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенным 0,3 М NH₄-формиатным буфером с 0,045 М NH₄Cl. Уровень дейтерированности рибозина по данным масс-спектрометрии FAB составил пять атомов дейтерия (62,5% D) с включением трех атомов дейтерия в рибозный и двух атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы.

Для адаптации к D₂O микроводоросли *C. vulgaris* использовали жидкие минеральные среды Тамия, содержащие 25, 50, 75 и 98% D₂O. В случае с *C. vulgaris* и *H. halobium* и использовали освещение лампами дневного света ЛБ-40, поскольку оба микроорганизма развиваются в присутствии света. Выделенные селекцией отдельные колонии клеток, устойчивые к D₂O, выращивали в жидких средах аналогичного состава с 99,8 ат.% D₂O для наработки дейтеро-биомассы.

При выращивании *H. halobium* в GC 2 среде в клетках синтезировался каротиноидсодержащий фиолетовый пигмент, по спектральному соотношению белкового и хромофорного фрагментов молекулы D₂₈₀/D₅₆₈ 1,5:1 идентичный природному БР. Рост галобактерий в D₂O-среде ингибировался незначительно по сравнению с контрольной протонированной средой, что существенно упрощает оптимизацию условий наработки дейтерированной биомассы галобактерий, заключающейся в выращивании галобактерий в дейтерированной среде с 20% гидролизатом дейтеро-биомассы *B. methylicum*, выделением фракции пурпурных мембран, отделением низко- и высокомолекулярных примесей, клеточной РНК, каротиноидов и липидов с последующим растворением белка в 0,5% SDS-Na и осаждением метанолом. Суммарный уровень дейтерированности БР, рассчитанный по уровням дейтерированности аминокислот белкового гидролизата, составил 95% D.

Проведенные нами исследования свидетельствуют, что способность к адаптации к D₂O у разных таксономических групп микроорганизмов различная и определяется как таксономической принадлежностью микроорганизмов, так и особенностями метаболизма, функцио-

нированием различных путей ассимиляции субстратов, а также эволюционной нишей, которую занимает исследуемый объект. При этом чем ниже уровень эволюционного развития организма, тем лучше он приспособляется к присутствию дейтерия в среде. Так, из изученных объектов наиболее примитивными в эволюционном плане (строение клеточной мембраны, биохимия, устойчивость к внешним факторам среды) являются галобактерии, относящиеся к археобактериям, стоящие обособленно как от прокариотических, так и от эукариотических микроорганизмов, обнаруживающих повышенную устойчивость к D₂O, и практически не нуждающиеся в адаптации к D₂O, что нельзя сказать о микроводорослях, которые, будучи эукариотами, труднее всех адаптируются к D₂O и проявляют ингибирование роста в 70-75% D₂O.

В процессе адаптации к D₂O немаловажную роль играет состав питательной среды, поскольку причинами ингибирования роста клеток и их гибели могут стать изменения соотношения синтезируемых метаболитов: аминокислот, белков и углеводов в D₂O-средах. Отмечено, что адаптация к D₂O проходит легче в комплексных средах, содержащих БВК дрожжей, при постепенном увеличении содержания дейтерия в среде, так как чувствительность к D₂O разных жизненно важных систем различна. Как правило, даже высокодейтерированные среды содержат протоны от 0,2-10% H. Остаточные протоны в момент адаптации к D₂O облегчают перестройку к изменившимся условиям, предположительно встраиваясь именно в те участки, которые наиболее чувствительны к замене атомов водорода на дейтерий. Также были выявлены существенные различия в морфологии дейтерированных

и протонированных клеток *C. vulgaris*. Клетки *C. vulgaris*, выращенные на D_2O -средах, имели в 2-3 раза большие размеры и более толстую клеточную стенку, чем контрольные клетки, выращенные на обычной протонированной среде. Тамия с обычной водой; распределение в них ДНК было неравномерным. В некоторых случаях на поверхности мембран наблюдались участки, состоящие из плотно упакованных складок цитоплазматической мембраны, напоминающие мезосомы. Кроме того, для дейтерированной *C. vulgaris* было также характерно резкое изменение формы клеток и направления их деления. Наблюдавшееся деление не заканчивалось обычным расхождением дочерних клеток, а приводило к образованию атипичных клеток, описанных в работах других авторов [2]. Наблюдаемые морфологические изменения, связанные с торможением роста дейтерированных клеток, обусловлены перестройкой в процессе адаптации к D_2O . Факт, что дейтерированные клетки имеют более крупные размеры (кажущийся размер в 2-4 раза превосходит размер протонированных клеток), является общебиологическим и наблюдается при выращивании в D_2O целого ряда других адаптированных нами прокариотических и эукариотических клеток.

Полученные нами данные, в целом, подтверждают устойчивое представление о том, что адаптация к D_2O является фенотипическим явлением, поскольку адаптированные к D_2O клетки возвращаются после их переноса в обычные водные среды к нормальному росту после некоторого лаг-периода. В то же время эффект обратимости роста на H_2O/D_2O средах не исключает возможности того, что определенный генотип детерминирует проявление одного и того же фенотипического

признака в средах различного изотопного состава. При попадании клетки в тяжёловодородную среду, лишённую протонов, из неё не только удаляется протонированная вода за счет реакции обмена H_2O-D_2O , но и происходит быстрый изотопный (H-D) обмен в гидроксильных (-OH), сульфгидрильных (-SH) и аминогруппах (-NH₂) молекул всех органических соединений, включая белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и липиды. Известно, что в этих условиях только ковалентная C-H связь не подвергается изотопному обмену, и вследствие этого только соединения со связями типа C-D могут синтезироваться *de novo* [7]. В зависимости от положения атома дейтерия в молекуле, различают первичные и вторичные изотопные эффекты, опосредованные межмолекулярными взаимодействиями. В этом аспекте наиболее важными для структуры макромолекулы являются динамические короткоживущие водородные (дейтериевые) связи, формирующиеся между соседними атомами дейтерия (водорода) и гетероатомами кислорода, углерода, азота, серы и D_2O из окружающей среды, играющие главную роль в поддержании пространственной структуры макромолекул и в межмолекулярных взаимодействиях. Другое важное свойство определяется пространственной структурой D_2O , имеющей тенденцию сближать гидрофобные группы макромолекул, чтобы минимизировать их эффект на водородную (дейтериевую) связь в D_2O . Поэтому структура макромолекул белков и нуклеиновых кислот в присутствии D_2O стабилизируется [15].

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что клетка реализует особые адаптивные механизмы, способствующие функциональной реорганизации работы жизненно важ-

ных систем в D_2O . Так, нормальному синтезу и функционированию в D_2O таких жизненно важных соединений как нуклеиновые кислоты и белки способствует поддержание их структуры посредством формирования водородных (дейтериевых) связей в молекулах. Связи, сформированные атомами дейтерия, различаются по прочности и энергии от аналогичных водородных связей. Несколько большая прочность связи D-O по сравнению с H-O обуславливает различия в кинетике реакций в D_2O и H_2O . По теории абсолютных скоростей разрыв C-H-связей происходит быстрее, чем C-D-связей, подвижность иона D^+ меньше, чем подвижность H^+ , константа ионизации D_2O несколько меньше константы ионизации H_2O [6]. Эти факторы приводят к замедлению скоростей ферментативных реакций в D_2O [16]. Однако существуют и такие реакции, скорость которых в D_2O выше, чем в H_2O . В основном, это реакции, катализируемые ионами D_3O^+ или H_2O^+ или OD^- и OH^- .

Отмечено, что вследствие изотопных эффектов дейтерия в D_2O синтезируются молекулы с другими структурно-функциональными свойствами и активностью, чем молекулы, образованные с участием водорода. Они также могут стать причиной различий в синтезах нуклеиновых кислот, которые могут приводить к структурным и функциональным изменениям в клетке и её органеллах. Так, структурно-динамические свойства клеточной мембраны, которые в большинстве зависят от качественного и количественного состава липидов, также могут изменяться в присутствии D_2O . В клетках бактерий мембрана является одним из важнейших инструментов регуляции метаболизма, объединяя в себе аппараты биосинтеза полисахари-

дов, трансформации энергии, снабжения клетки питательными веществами и участвуя в биосинтезе белков, нуклеиновых кислот и липидов. Очевидно, при адаптации к D_2O мембраны играют важную роль. Однако окончательно не выяснено, что происходит с мембранами, как они реагируют на замену H^+ на D^+ и какое это имеет значение для выживания клеток в D_2O -среде, лишённой протонов.

Сравнительный анализ липидного состава дейтерированных клеток хемогетеротрофной бактерии *B. subtilis*, полученных при росте в максимально дейтерированной D_2O -среде (ГС1-среда), осуществлённый методом ВЭЖХ, показал существенные различия в количественном составе мембранных липидов по сравнению с липидами, полученными на обычной воде (рис. 2а, б). Характерно, что в образце, полученном в D_2O -среде, соединения, имеющие времена удерживания 33,38; 33,74; 33,26 и 36,03 мин, не детектируются (рис. 2б). Полученный результат, по-видимому, объясняется тем, что клеточная мембрана является одной из первых органелл клетки, испытывающей воздействие D_2O , и тем самым компенсирует реалогические параметры мембраны (вязкость, текучесть, структурированность) изменением не только количественного, но и качественного состава липидов. Аналогичная ситуация наблюдалась и с разделением других природных соединений (белки, аминокислоты, углеводы), выделенных из дейтерированной биомассы с D_2O -среды.

Анализ аминокислот белковых гидролизатов и внутриклеточных углеводов, выделенных из клеток *B. subtilis*, также выявил заметные различия в биосинтезе этих природных соединений в максимально дейтерированной D_2O -среде (ГС1-среда). Белковый гидролизат

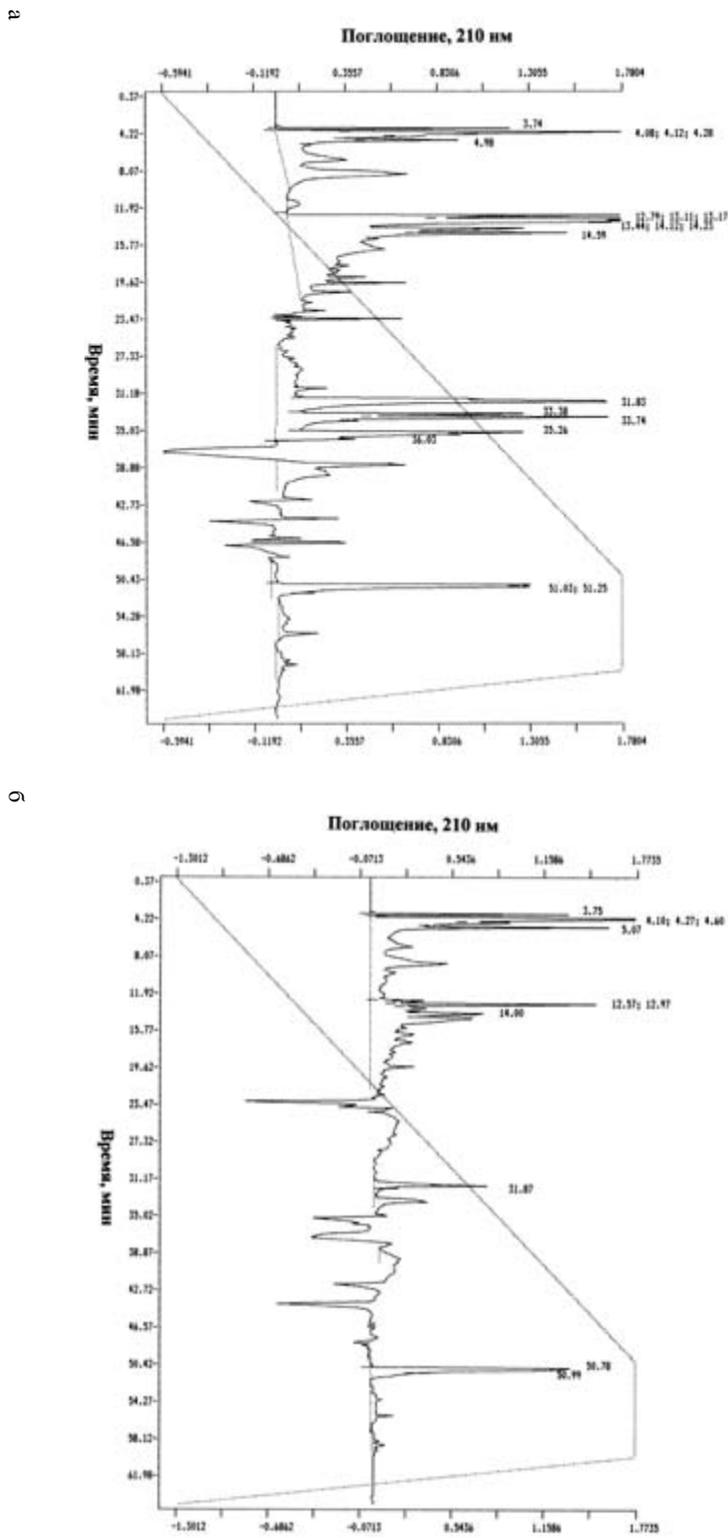


Рис. 2. Липидные профили протонированных (а) и дейтерированных (б) клеток бактерии *B. subtilis*, выделенных с максимальной дейтерированной D₂O-среды (ГС1-среда); хроматограф Beckman Gold System (США), детектор Model 126 (США); неподвижная фаза: Ultrasphere ODS 5 мкм; 4,6 x 250 мм; подвижная фаза: линейный градиент 5 мМ КН₂РО₄-ацетонитрил (показан пунктиром); скорость элюции: 0,5 мл/мин; детекция при λ=210 нм. Пики на хроматограммах с временами удерживания: 3,75 (вместо 3,74 в контроле); 4,10; 4,27; 4,60 (вместо 4,08; 4,12; 4,28 в контроле); 5,07 (вместо 4,98 в контроле); 12,57; 12,97 (вместо 12,79; 13,11; 13,17 в контроле); 14,00 (вместо 14,59 в контроле); 31,87 (вместо 31,83 в контроле); 33,38; 33,74; 33,26; 36,03; 50,78; 50,99 (вместо 51,03; 51,25 в контроле) соответствуют индивидуальным внутриклеточным липидам.

B. subtilis представлен пятнадцатью идентифицированными аминокислотами (за исключением пролина, который детектировался при λ=440 нм) при выходах аминокислот, сопоставимых с потребностями используемых бактерий в источниках углерода и аминного азота (табл. 2). Индикатором, определяющим высокую эффективность включения дейтерия в белковый гидролизат, служат высокие

уровни дейтерированности молекул аминокислот, которые варьируют от 49% D для лейцина/изолейцина до 97,5% D для аланина.

Фракция внутриклеточных углеводов *B. subtilis* при росте в максимально дейтерированной D₂O-среде (ГС1-среда) в табл. 3 (нумерация приведена по последовательности их элюции с колонки) представлена моносахаридами (глюкоза,

Таблица 2

Аминокислотный состав белкового гидролизата *B. subtilis*, полученный с максимально дейтерированной среды*, и уровни дейтерированности молекул

Аминокислота	Выход, % от сухого веса 1 г биомассы	Величина молекулярного иона производных аминокислот [M] ^{**}	Количество включенных атомов дейтерия в углеродный скелет молекулы ^{***}	Уровень дейтерированности молекул, % от общего количества атомов водорода ^{****}
Глицин	9,69	324	2	90,0
Аланин	13,98	340	4	97,5
Валин	3,74	369	4	50,0
Лейцин	7,33	383	5	49,0
Изолейцин	3,64	383	5	49,0
Фенилаланин	3,94	420	8	95,0
Тирозин	1,82	669	7	92,8
Серин	4,90	355	3	86,6
Треонин	5,51	не детектировался	—	—
Метионин	2,25	не детектировался	—	—
Аспарагин	9,59	396	2	66,6
Глутаминовая кислота	10,38	411	4	70,0
Лизин	3,98	632	5	58,9
Аргинин	5,27	не детектировался	—	—
Гистидин	3,72	не детектировался	—	—

Примечания:

* Данные получены на ГС1 среде с 99,8% D₂O и 2% гидролизатом дейтеро-биомассы *B. methylcum*.

** Данные получены для метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот.

*** При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных COOH- и аминок NH₂ группах молекул аминокислот не учитывались из-за лёгкости изотопного (H-D) обмена.

**** Прочерк означает отсутствие данных.

фруктоза, рамноза, арабиноза), дисахаридами (мальтоза, сахароза), а также четырьмя другими неидентифицированными углеводами с временами удерживания 3,08 (15,63%); 4,26 (7,46%); 7,23 (11,72%) и 9,14 (7,95%) мин (не показаны). Выход глюкозы в дейтерированном образце составляет 21,4% от сухого веса, то есть выше, чем фруктозы (6,82%), рамнозы

емые изменения клеток при росте на D₂O сопровождались изменениями физиологических и морфологических параметров клетки, а также соотношения синтезируемых белков, аминокислот, углеводов и липидов, по-видимому, обусловлены структурно-функциональной перестройкой в процессе адаптации к D₂O. Суммируя полученные данные, можно сделать

Таблица 3

Качественный и количественный состав внутриклеточных углеводов *B. subtilis* при росте в максимально дейтерированной среде* и уровни дейтерированности молекул

Углевод	Содержание в биомассе, в % от сухого веса 1 г биомассы		Уровни дейтерированности молекул, %
	Протонированный образец (контроль)	Образец, полученный в 99,8% D ₂ O	
Глюкоза	20,01	21,40	80,6
Фруктоза	6,12	6,82	85,5
Рамноза	2,91	3,47	90,3
Арабиноза	3,26	3,69	90,7
Мальтоза	15,30	11,62	—
Сахароза	8,62	не детектировалась	—

Примечания:

* Данные получены на GC1 среде с 99,8% D₂O и 2% гидролизатом дейтеро-биомассы *B. methylicum*.

(3,47%), арабинозы (3,69%) и мальтозы (11,62%). Их выходы существенно не отличались от контроля в H₂O, за исключением сахарозы, которая в дейтерированном образце не детектировалась (табл. 3). Уровни дейтерированности углеводов составили от 90,7% D для арабинозы до 80,6% D для глюкозы.

Выводы

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что эффекты, наблюдаемые при клеточной адаптации к D₂O, относятся к комплексному многофакторному воздействию, влияющему на многие системы организма. Наблюда-

вывод, что чувствительности различных клеточных систем к D₂O отличны. С точки зрения физиологии, наиболее чувствительными к замене H⁺ на D⁺ являются аппарат биосинтеза и дыхательная цепь, т.е. именно те клеточные системы, которые используют высокую подвижность протонов и высокую скорость разрыва водородных связей. Последний факт позволяет рассматривать адаптацию к D₂O как к неспецифическому фактору, действующему одновременно на функциональное состояние большого числа систем: метаболизм, пути ассимиляции углеродных субстратов, биосинтетические процессы, структуру и функции макромолекул.

Нам представляется целесообразным выбор микроорганизмов в качестве биомоделей в этих исследованиях, поскольку они очень хорошо адаптируются к внешним условиям и способны выдерживать высокие концентрации D₂O в ростовых средах.

Список литературы

1. **Денько Е.И.** Действие тяжелой воды (D₂O) на клетки животных, растений и микроорганизмы // Усп. совр. биол. 1970. Т. 70. № 4. 41 с.
2. **Ерёмин В.А., Чекулаева Л.Н.** Выращивание бактерий *Micrococcus lysodeikticus* на дейтерированной среде // Микробиология. 1978. Т. 14. С. 125-136.
3. **Кишенбаум И.** Тяжелая вода // В кн: Физические свойства и методы анализа: Пер. с англ. - М.: Атомиздат. 1953. 98 с.
4. **Лобышев В.Н., Калинин Л.П.** Изотопные эффекты D₂O в биологических системах. - М.: Наука. 1978. 215 с.
5. **Мосин О.В., Складнев Д.А., Швеиц В.И.** Включение дейтерированных ароматических аминокислот в молекулу бактериородопсина *Halobacterium halobium* // Прикл. биохим. Микробиол. 1999. Т. 35. № 1. С. 34-42.
6. **Мосин О.В., Складнев Д.А., Швеиц В.И.** Исследование физиологической адаптации бактерий на тяжёловодородной среде // Биотехнология. 1999. № 8. С. 16-23.
7. **Мосин О.В., Складнев Д.А., Швеиц В.И.** Методы получения белков и аминокислот, меченных стабильными изотопами 2H, 13C и 15N // Биотехнология. 1996. № 3. С. 12-32.
8. **Мосин О.В.** Дейтерий, тяжелая вода, эволюция и жизнь // Водоочистка, водоподготовка, водоснабжение. 2009. № 8. С. 64-70.

9. **Мосин О.В., Игнатов И.** Изотопные эффекты дейтерия в клетках бактерий и микроводорослей // Вода: химия и экология. 2012. № 3. С. 83-94.

10. **Мосин О.В., Казаринова Л.А., Преображенская К.А., Складнев Д.А., Чеботаев Д.В., Юркевич А.М., Швеиц В.И.** Рост бактерии *Bacillus subtilis* на высокодейтерированной среде // Биотехнология. 1996. № 4. С. 19-27.

11. **Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швеиц В.И.** Масс-спектрометрическая оценка уровня включения 2H и 13C в молекулы аминокислот бактериальных объектов // Биорган. химия. 1996. Т. 22. № 10-11. С. 856-869.

12. **Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Юркевич А.М., Швеиц В.И.** Изучение биосинтеза аминокислот штаммом *Brevibacterium methylicum* при росте на средах, содержащих тяжелую воду и дейтерометанол // Биотехнология. 1996. № 3. С. 3-12.

13. **Складнев Д.А., Мосин О.В., Егорова Т.А., Еремин С.В., Швеиц В.И.** Метилотрофные бактерии – источники изотопномеченных 2H- и 13C-аминокислот // Биотехнология. 1996. № 5. С. 25-34.

14. **Стом Д.И., Пономарева А.Л., Вятчина О.Ф.** Влияние воды с измененным количеством дейтерия на красного калифорнийского гибрида (*Eusenia fetida* Andrei Bouche) // Бюлл. ВСНЦ СО РАН. 2006. Т. 6. № 52. С. 167-169.

15. **Cioni P., Strambini G.B.** Effect of Heavy Water on Protein Flexibility // Biophysical J. 2002. V. 82(6). P. 3246-3253.

16. **Cleland W.N., O'Leary M.H., Northrop D.D.** Isotope Effects on Enzyme-Catalyzed Reactions. - Baltimore, London, Tokyo: University Park Press. 1976. 303 p.

17. **Crespi H.L.** Fully deuterated microorganisms: tools in magnetic

resonance and neutron scattering. Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds // In: Proceedings of an International Symposium. Baillie T, Jones J.R eds. - Amsterdam: Elsevier. 1989. P. 329-332.

18. **Kushner D.J., Baker A., Dunstall T.G.** Pharmacological uses and perspectives of heavy water and deuterated compounds // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1999. V. 77(2). P. 79-88.

19. **LeMaster D.M.** Uniform and selective deuteration in two-dimensional NMR studies of proteins // Ann. Rev. Biophys. Chem. 1990. V. 19. P. 243-266.

20. **Lis G., Wassenaar L.J., Hendry M.J.** High-Precision Laser Spectroscopy D/H and 18O/16O Measurements of Microliter Natural Water Samples // Anal. Chem. 2008. V. 80(1). P. 287-293.

21. **MacCarthy P.** Infrared spectroscopy of deuterated compounds: an undergraduate

experiment // J. Chem. Educ. 1985. V. 62(7). 633 p.

22. **Mosin O.V., Karnaukhova E.N., Pshenichnikova A.B., Reshetova O.S.** Electron impact mass-spectrometry in bioanalysis of stable isotope labeled bacteriorhodopsin // In: 6th Intern. Conf. on Retinal proteins. - Leiden, the Netherlands: Springer Verlag. 1994. 115 p.

23. **Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I.** Biosynthesis of 2H-labeled phenylalanine by a new methylotrophic mutant *Brevibacterium methylicum* // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 1998. V. 62(2). P. 225-229.

24. **Vertes A.** Physiological effects of heavy water. Elements and isotopes: formation, transformation, distribution. - Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 2004. 112 p.

Studying of isotopic effects of heavy water (D₂O) in biological systems on example of prokaryotic and eukaryotic cells

O. V. Mosin, I. Ignatov

Isotope effects of deuterium (D) in cells of various taxonomic groups of prokaryotic and eucaryotic microorganisms realizing methylotrophical, chemoheterotrophical, photoorganotrophical, and photosynthetic ways of assimilation of carbon substrates (methylotrophic bacteria, halobacteria, green microalgae) are investigated at growth on media with heavy water (D₂O). The method of step by step adaptation technique of cells to D₂O is developed, consisting in plating of clls on 2% agarose nutrient media containing increasing gradient of concentration of D₂O (from 0 up to 98% D₂O) and the subsequent selection of stable to D₂O cells. Obtained from growth media with a low gradient of D₂O concentration, cells were further transferred on growth media with higher gradient of D₂O concentration, up to 98% D₂O. In the result of that technique it were obtained adapted to maximum concentration of D₂O cells, biological material of which instead of hydrogen contained deuterium with levels of enrichment 95% D. Usage of cells adapted to D₂O and deuterated natural compounds (protein, amino acids, nucleosides, pigments, carboxydrates, lipids), extracted from them, can find further application in biophysical researches and biomedical technologies.

Key words: deuterium, heavy water, adaptation, isotopic effects, bacteria, microalgae.

Структурная реорганизация бедренной и большеберцовой артерий, малоберцового нерва и хряща коленного сустава при экспериментальных переломах костей голени у собак и их лечении методом чрескостного остеосинтеза

Н.А. Щудло, Т.Н. Варсегова, Т.А. Ступина, И.В. Борисова

ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова Минздравсоцразвития России», г. Курган

Контактная информация: к.б.н. Варсегова Татьяна Николаевна varstn@mail.ru

У 18 взрослых беспородных собак моделировали оскольчатые переломы голени. Проведено комплексное гистологическое исследование с применением компьютерной морфометрии бедренных и передних большеберцовых артерий, поверхностного малоберцового нерва, хряща коленного сустава в разные сроки фиксации голени в аппарате Г.А. Илизарова (14, 21, 35-37 и 48-50 суток), через 30 и 90 суток после снятия аппарата (80 и 140 суток эксперимента, соответственно). Признаки механического повреждения передней большеберцовой артерии выявлены в 22,2% опытов, повреждения малоберцового нерва – в 11,1% случаев. Установлено, что динамика изменений среднего диаметра передней большеберцовой артерии оперированной конечности, диаметра просвета и толщины её стенки зависела от интенсивности остеогенеза. Увеличение абсолютной величины морфометрических показателей наблюдается у животных с ускоренной консолидацией перелома (35-37 суток), при фиксации в аппарате в течение 48-50 дней все морфометрические показатели имели тенденцию снижения по сравнению с периодом 14-21 дней фиксации. Увеличение калибра и просвета артерий сопровождалось формированием дефектов внутренней эластической мембраны, протяжённость которых в поперечных срезах превышала 30% периметра люминальной поверхности. В опытах с отсутствием признаков механического повреждения малоберцового нерва выявлены изменения эпинеурия и перинеурия, которые свидетельствуют об усилении структурно-функциональных характеристик перинеурального барьера и гистогенезе структур, обеспечивающих механическую прочность нерва и поддержание гомеостаза среды микроокружения нервных волокон. В суставном хряще выявлены деструктивные изменения, выражающиеся разволокнением межклеточного вещества поверхностной зоны, гибелью части хондроцитов, снижением толщины хряща и численной плотности хондроцитов. Вплоть до 140 суток опыта репаративная регенерация хряща имела незавершённый характер. Полученные экспериментальные данные необходимы для разработки эффективных методов поддерживающей терапии и функциональной реабилитации пострадавших с переломами костей.

Ключевые слова: переломы, ремоделирование артерий, регенерация нервов, хряща.

Введение

Переломы большеберцовой кости печально известны как повреждения, которые «нечасто отбирают жизнь, но часто её меняют» [17]. Анатомические особенности голени определяют высокую частоту открытых переломов, создающих риск инвалидизирующих осложнений. Ранний остеосинтез аппаратом

Г.А. Илизарова признаётся методом выбора в лечении этих переломов, поскольку он обеспечивает оптимальные условия для костного сращения и восстановления утраченных функций [5, 8, 19]. Однако функциональная реабилитация таких пострадавших относится к трудным проблемам травматологии.

Принято считать, что главная причина

функционального дефицита – длительная гипокинезия, которая приводит не только к атрофии мышц от бездействия, но и к снижению активного и пассивного объёма движений в суставах. Следует также учитывать, что при открытых переломах большеберцовой кости нередки нейрососудистые осложнения, которые могут быть результатом прямой механической травмы сосудисто-нервных пучков, выявленной в 14,6% случаев [18], и следствием компартмент-синдрома [15]. Особыми проблемами являются иатрогенные повреждения сосудисто-нервных пучков при остеосинтезе, а также ложные артериальные и венозные аневризмы, развивающиеся в отдалённом периоде после переломов голени [16].

На основании анализа клинического материала невозможно составить целостные представления о характере и выраженности механических и гемодинамических повреждений сосудисто-нервных пучков, структурных изменений суставного хряща, а также о механизмах компенсаторно-приспособительных реакций. Эти знания необходимы для разработки адекватной патогенетически обоснованной реабилитационной программы, направленной на улучшение качества жизни пострадавших с последствиями открытых переломов костей голени. Очевидна целесообразность экспериментальных исследований соответствующего направления.

Цель работы – выявление закономерностей структурной реорганизации бедренной и передней большеберцовой артерий, поверхностного малоберцового нерва и суставного хряща мышечков бедра при экспериментальном моделировании оскольчатых переломов голени, леченных методом чрескостного остеосинтеза.

Материалы и методы

Эксперимент проведен совместно с к.м.н. Н.В. Петровской и к.в.н. М.А. Степановым на 18 беспородных собаках обоего пола с массой тела 11-20 кг, в возрасте 3-5 лет. Собаки содержались в виварии, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии требованиями Министерства здравоохранения Российской Федерации к работе экспериментально-биологических клиник, а также «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены этическим комитетом. Оперативные вмешательства проводили в условиях операционной, под внутривенным комбинированным наркозом моделировали открытый оскольчатый перелом в средней трети правой голени ударом груза массой 5 кг в свободном падении с высоты 1,5 м. В течение суток осуществляли иммобилизацию голени шиной и дополнительное обезболивание, затем выполняли закрытый чрескостный остеосинтез аппаратом Илизарова. Период фиксации голени в аппарате варьировал от 35 до 50 суток. Животные выводились из эксперимента передозировкой барбитуратов в разные сроки фиксации голени в аппарате (14, 21, 35-37 и 48-50 суток), через 30 и 90 суток после снятия аппарата (80 и 140 суток эксперимента, соответственно).

Для морфологического исследования иссекали участки поверхностного малоберцового нерва на уровне средней трети голени, участки бедренных и передних большеберцовых артерий оперированной и контралатеральной конечностей, участки хряща коленного сустава.

Для изготовления полутонких сре-

зов нервов, артерий и суставного хряща материал фиксировали в смеси 2% растворов глутарового и параформальдегидов на фосфатном буфере (рН 7,4) с добавлением 0,1% пикриновой кислоты, постфиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия с 1,5% красной кровяной солью и заливали в аралдит. Поперечные полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим и основным фуксином. В оцифрованных на аппаратно-программном комплексе «DiaMorph» (Москва) изображениях полутонких срезов нервов определяли суммарную площадь пучков нервных волокон, численные плотности миелиновых, безмиелиновых нервных волокон и эндоневральных микрососудов и долю (в %) деструктивно измененных миелиновых нервных волокон.

Гистоморфометрический анализ суставного хряща мышечков бедра проводили по полутонким эпоксидным срезам большой площади, изготовленным по разработанной нами технологии [7, 10]. Для точко-счётной объёмометрии использовали электронную версию оригинальной тестовой решетки [13], состоящей из 100 узлов с прозрачными центрами. Определяли толщину хряща (h_{xp}), рассчитывали численную (NA_{xc}) плотность всех хондроцитов в ткани, а также численную плотность изогенных групп ($NA_{из.гр}$) и пустых лакун ($NA_{пуст.лак}$) в общем объёме выборки (%).

Для получения нормативных данных соответствующими морфометрическими методами изучили поверхностные малоберцовые нервы [2] и суставной хрящ [6] 5-ти интактных взрослых беспородных собак.

Гистологическое исследование участков бедренных и большеберцовых артерий проведено методами световой микроскопии и морфометрии цифровых

изображений поперечных серийных парафиновых (окраски гематоксилин-эозином, по ван Гизону, Массону и Харту) и полутонких эпоксидных (окраска по Уикли) срезов. При количественном анализе определяли размерные параметры передней большеберцовой артерии: средний ортогональный диаметр (D), диаметр просвета (DL), толщину меди (НМ) и внутреннего слоя адвентиции. Рассчитывали относительную разницу каждого из указанных параметров артерии оперированной и контралатеральной конечностей по формуле:

$$(D, DL, НМ, НА)_{oper} - (D, DL, НМ, НА)_{contr} / (D, DL, НМ, НА)_{oper} * 100\%$$

Проверку статистических гипотез о различиях осуществляли с помощью параметрических и непараметрических критериев в программе AtteStat, версия 1.0 [4] в электронных таблицах Microsoft Excel 97.

Результаты и их обсуждение

При взятии материала для гистологического исследования установлено, что во всех экспериментах сосудисто-нервные пучки голени сохраняли свою анатомическую непрерывность на всём протяжении.

При микроскопии гистологических срезов передней большеберцовой артерии установлено, что у 4 собак из 18 (у 3 срок опыта 14-21 суток фиксации в аппарате, у одной – 49 суток фиксации в аппарате) наблюдались признаки механического повреждения артерий. В отличие от контралатеральных, повреждённые артерии полностью лишены эндотелия, субэндотелиального слоя и внутренней эластической мембраны, площадь просвета уменьшена в 7-8 раз. Просвет окружён миоинтимальным утолщением, в составе которого преобладают гладко-

мышечные клетки, и присутствует множество пенистых фагоцитов. Адвентиция фиброзно изменена.

У остальных животных в сроки 14 и 21 сутки фиксации в бедренных и большеберцовых артериях оперированной и контралатеральной конечностей выявлены разной степени выраженности признаки гемодинамических повреждений и репаративных реакций. Наибольшие изменения выражены в интиме и внутренней эластической мембране (ВЭМ). Наряду с участками дезэндотелизации и повреждениями субэндотелиального слоя встречались признаки дезинтеграции ВЭМ – эластолиза с формированием дефектов, значительно превышавших нормальные поры (рис. 1А). В отдельных случаях их протяжённость была значительной как по длиннику, так и по периметру сосуда, достигая более 30% периметра люминальной поверхности. Дефекты ВЭМ в отдельных случаях были замещены частоколом эндотелиальных и модифицированных веретёновидных гладкомышечных клеток, в других – фиброзным

рубцом (рис. 1Б). В полутонких срезах выявлялись признаки эластогенеза – формирования редупликаций ВЭМ или фрагментов эластина в зонах её дефектов. В участках с сохранившейся ВЭМ нередко выявлялся субинтимальный фиброз. Дезинтеграция эластических структур выявлялась также в меди и внутреннем слое адвентиции. Медия содержала участки фиброзно-мышечной гиперплазии, которые располагались преимущественно в её внутреннем слое и отличались продольным по отношению к длиннику сосуда расположением миоцитов. По всей толще меди встречались миоциты с признаками дистрофических и некротических изменений, а также пенистые фагоциты. Адвентиция отличалась от нормальной повышенным содержанием клеточных элементов. У всех собак этого периода эксперимента в передней большеберцовой артерии оперированной конечности толщина адвентиции и меди была больше, чем на контралатеральной стороне. Процентная разница диаметров просвета варьировала от -12,9 до +40%.

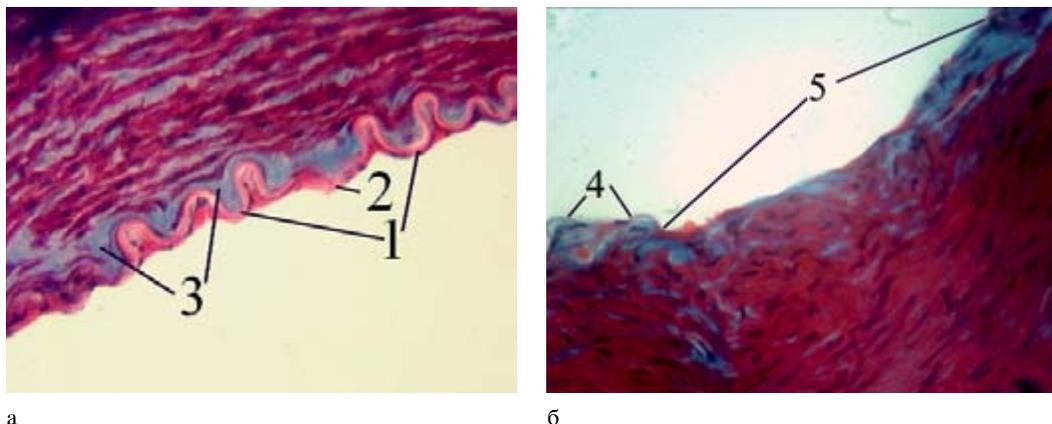


Рис. 1. а – фрагмент поперечного парафинового среза правой бедренной артерии через 14 суток фиксации в аппарате; б – фрагмент поперечного парафинового среза правой передней большеберцовой артерии через 21 сутки фиксации в аппарате. Окраска Массон-трихром, увеличение 500х. 1 – сохранившиеся участки внутренней эластической мембраны. 2 – участки её спрямления и лизиса. 3 – субинтимальный фиброз. 4 – остатки внутренней эластической мембраны. 5 – фиброзное замещение полнослойного дефекта интимы.

У двух собак этого срока описанные выше изменения сочетались с синдромом хронического сдавления передней большеберцовой артерии, проявляющимся гиперваскуляризацией адвентиции и выраженными дегенеративными изменениями меди.

Через 35-37 суток фиксации в зонах дефектов ВЭМ большеберцовых и бедренных артерий (рис. 2) отчётливо выявлялись новообразованные эластические структуры, которые подвергались вторичному эластолизу. Толщина стенки передней большеберцовой артерии оперированной конечности была больше контралатеральной, а процентная разница диаметров просвета варьировала от -1,6% до +26,6%.

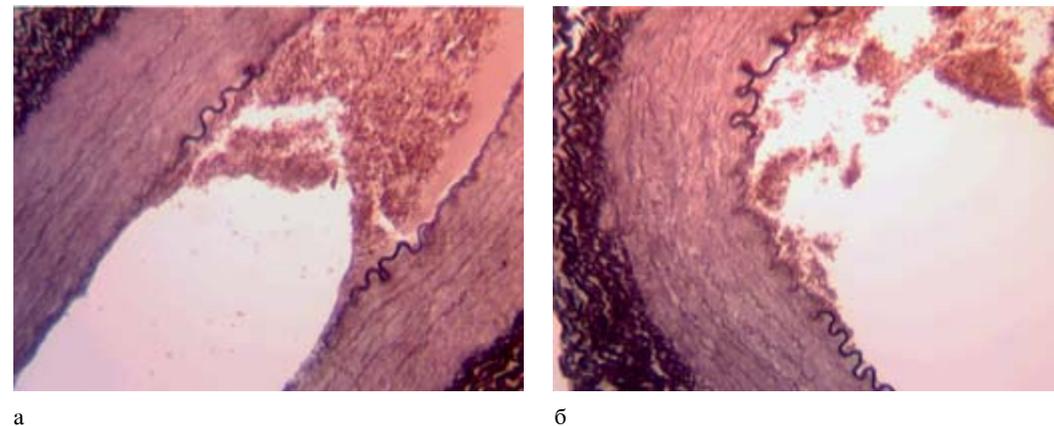


Рис. 2. Фрагменты поперечных полутонких срезов правой (а) и левой (б) бедренных артерий через 35 суток фиксации в аппарате. Окраска по Харту, увеличение 180х. Чередование участков с сохранившейся эластической мембраной с участками эластолиза, эластогенеза и вторичного эластолиза.

В срок 48-50 суток фиксации (группа с замедленной консолидацией перелома, n=3) у двух собак выявлен синдром хронического сдавления передней большеберцовой артерии, причём у одной он сочетался с обтурирующим тромбозом. Ещё у одной собаки, как было указано выше, выражены признаки констриктив-

ного ремоделирования передней большеберцовой артерии в результате механического повреждения.

В период после снятия аппарата (через 30 и 90 суток) процентная разница диаметров просвета передней большеберцовой артерии варьирует от -22,2 до +50,8%. На стороне с большим просветом определяется неравномерное истончение меди. Создаётся впечатление, что происходит оно, главным образом, за счёт запустевания наружных слоёв меди в результате гибели и миграции миоцитов.

В таблице представлена динамика изменений среднего диаметра передней большеберцовой артерии оперированной конечности, диаметра просвета и толщины её стенки. Можно видеть, что увели-

чение абсолютной величины морфометрических показателей наблюдается у животных с ускоренной консолидацией перелома (35-37 суток). При фиксации в аппарате в течение 48-50 суток все морфометрические показатели имели тенденцию снижения по сравнению с периодом 14-21 сутки фиксации.

Таблица

Морфометрические характеристики правой большеберцовой артерии

Срок опыта, количество вариант	Размерные параметры – M ± SD (в микрометрах)			
	Диаметр артерии	Диаметр просвета	Толщина меди	Толщина ВЭМ
Ф14-21	1255 ± 167	582 ± 91	234 ± 24	110 ± 16
Ф35-37	1464 ± 85°	699 ± 49°	275 ± 21°	129 ± 12
Ф48-50	1186 ± 142	569 ± 113	219 ± 20	116 ± 33
Ф30-35БА30	1584 ± 134 * 1	749 ± 110*	286 ± 21 ** 1	148 ± 14*1

Примечания:

° – статистическая значимость различий (Ф14-21) и (Ф35-37),

* – $p < 0,05$ – статистическая значимость различий (Ф48-50) и (Ф30-35БА30),** – $p < 0,01$ – статистическая значимость различий (Ф48-50) и (Ф30-35БА30),1 – $p < 0,05$ – статистическая значимость различий (Ф14-21) и (Ф30-35БА30).

Через 14-21 сутки фиксации голени в аппарате у двух собак регистрируется повышение ($p < 0,05$) на 11-16% суммарной площади пучков нервных волокон малоберцового нерва оперированной конечности относительно аналогичных параметров контралатерального нерва. В эпиневррии малоберцовых нервов обнару-

живаются признаки реактивного воспаления с наличием лейкоцитарно-плазмодитарных инфильтратов, повышенным, по сравнению с интактным нервом, содержанием фибробластов, фиброцитов и тучных клеток. Стенки большинства эпиневральных кровеносных сосудов утолщены, просветы расширены, нередко

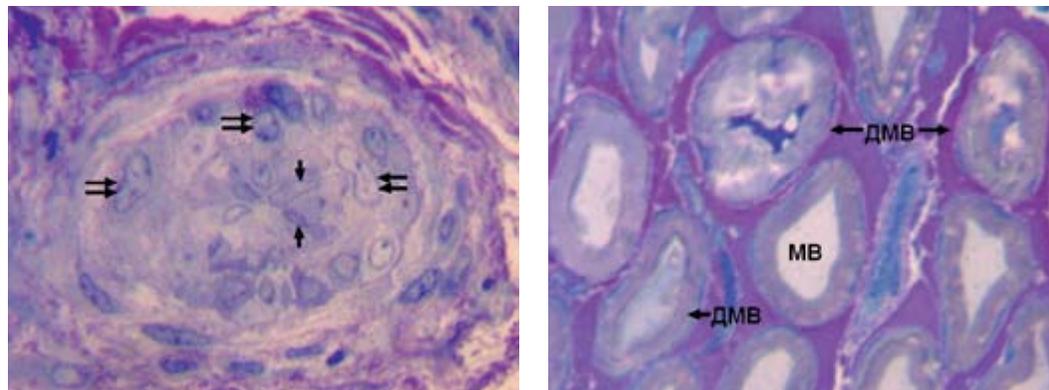


Рис. 3. Поверхностный малоберцовый нерв. Фиксация в аппарате 21 сутки.
а – эпиневральная артериола с облитерированным просветом. Стрелки – эндотелиоциты, выбухающие в просвет, двойные стрелки – апоптотные ядра гладкомышечных клеток; б – нервные волокна. МВ – миелиновые волокна, ДМВ – деструктивно измененные миелиновые волокна. Поперечный полутонкий срез, окраска метиленовым синим и основным фуксином. Увеличение 1250х.

состояние эритроцитарного стаза. Часть микрососудов имеют облитерированные просветы и признаки дистрофических и деструктивных изменений (рис. 3А).

Периневррий сохраняет тонколамеллярное строение, но возрастает количество ядер периневральных клеток, увеличиваются объемы волокнистых прослоек. Между слоями периневральных клеток формируются многочисленные мостики, представленные цитоплазматическими клеточными выростами. Ламеллоподии периневральных клеток внутреннего слоя периневррия армируют артерии и артериолы, анастомозирующие эпиневральное и эндоневральное сосудистые русла. Субпериневральные отеки отсутствуют.

Эндоневральные кровеносные сосуды, в отличие от интактного нерва, имеют, в основном, расширенные просветы, а отдельные – признаки деструктивных изменений клеточных элементов стенки. Численная плотность эндоневральных микрососудов на 21,7% превышает соответствующий параметр интактного нерва, составляя 281 ± 19 в 1 мм^2 (в интактном нерве – 220 ± 17).

Обнаруживаются миелиновые волокна с признаками демиелинизации, аксональной и валлеровской дегенерации (рис. 3Б). Гистоморфометрические исследования показали, что через 14 суток фиксации их доля (Deg%) составила $11,8 \pm 0,2\%$, а на 21 сутки – $8,9 \pm 3,9\%$, что в 6,2 и 4,7 раза выше значений интактного малоберцового нерва ($1,9 \pm 0,3\%$). В результате регенераторных процессов возрастает численная плотность миелиновых волокон (NA_{mf}): на 14 и 21 сутки фиксации NA_{mf} (24462 ± 2038 и 24166 ± 2486 в 1 мм^2 , соответственно) превышает ($p < 0,01$) аналогичный параметр интактного нерва (21335 ± 505) на

12,8% и 11,7%, соответственно. Численная плотность безмиелиновых волокон (NA_{anf}) через 14 суток фиксации снижается ($p < 0,01$) на 18,7% (13394 ± 701), а на 21 сутки (16359 ± 1614) приближается к норме (16479 ± 869).

Через 35-37 суток фиксации в аппарате, как и на предыдущем сроке эксперимента, у одной собаки обнаружено повышение на 5% ($p < 0,05$) суммарной площади пучков нервных волокон малоберцового нерва оперированной конечности относительно аналогичных параметров контралатерального нерва. В эпиневррии малоберцовых нервов выражены коллагеновые депозиты, наблюдается его гиперваскуляризация. Артериолы и венулы гипертрофированы. Часть сосудов, как и на предыдущих сроках, имеет признаки деструктивных изменений клеточных элементов. Периневррий сохраняет тонколамеллярное строение, волокнистые прослойки между слоями периневральных клеток остаются утолщенными. Численная плотность эндоневральных микрососудов остается высокой, составляя 287 ± 65 в 1 мм^2 . Продолжают встречаться волокна с признаками реактивно-деструктивных изменений, но Deg% уменьшается до 4,1%. Мелкие новообразованные волокна с тонкой миелиновой оболочкой единичны. NA_{mf} на 10,1% превышает значения интактного нерва (23742 ± 1188 , достоверность различий статистически не подтверждается), а NA_{anf} остается приближенной к норме.

Через 48-50 суток фиксации голени в аппарате достоверные различия по параметру «суммарная площадь пучков нервных волокон» отсутствуют. По сравнению с предыдущим сроком, в эпиневррии малоберцовых нервов снижается содержание клеточных элементов, но

сохраняется его гиперваскуляризация. У части артерий и артериол просветы расширены, у части – сужены, стенки утолщены. Периневрий утолщен. Просветы большинства эндоневральных микрососудов, как и в норме, спавшиеся, их численная плотность продолжает расти и составляет 307 ± 57 в 1 мм^2 , что на 28,3% выше ($p < 0,01$) значений интактного нерва. Визуально отмечается повышение количества миелиновых волокон в поле зрения, появление мелких новообразованных проводников. Гистоморфометрические исследования показали, что в результате происходящих в нерве регенераторных процессов NA_{mf} и NA_{amf} (28878 ± 1299 и 19620 ± 7470) существенно возрастают, и на 26,1% ($p < 0,01$) и 16,0%, соответственно, превышают норму – при этом статистически значимые отличия площади пучков нервных волокон нервов оперированной и контрлатеральной конечности отсутствуют. Продолжают встречаться волокна с признаками демиелинизации, аксональной и валлеровской дегенерации. Deg% составляет 5,7%.

У 2-х собак на данном сроке опыта в малоберцовых нервах обнаружены мел-

кие новообразованные аксоны в составе регенерационных кластеров (рис. 4а), что свидетельствует о предшествующей массовой деструкции нервных проводников с последующей регенерацией на фоне выраженного периневрального (рис. 4б) и эндоневрального фиброза.

На последующих сроках опыта (через 30 и 90 суток после снятия аппарата) достоверные различия по параметру «суммарная площадь пучков нервных волокон» отсутствуют. Эпиневральные микрососуды имеют нормальное строение, но их количество остается повышенным. В некоторых крупных пучках выявляются локальные субпериневральные отеки, отдельные периневральные клетки имеют вакуолизированную цитоплазму. Сохраняется гиперваскуляризация эндоневрия, просветы большинства микрососудов, как и в интактном нерве, спавшиеся, их численная плотность на 21,7% превышает ($p < 0,01$) значения интактного нерва. Клеточность эндоневрия остается повышенной: обнаруживаются единичные плазмциты, макрофаги, а в субпериневральных и периваскулярных пространствах встречаются тучные клетки.

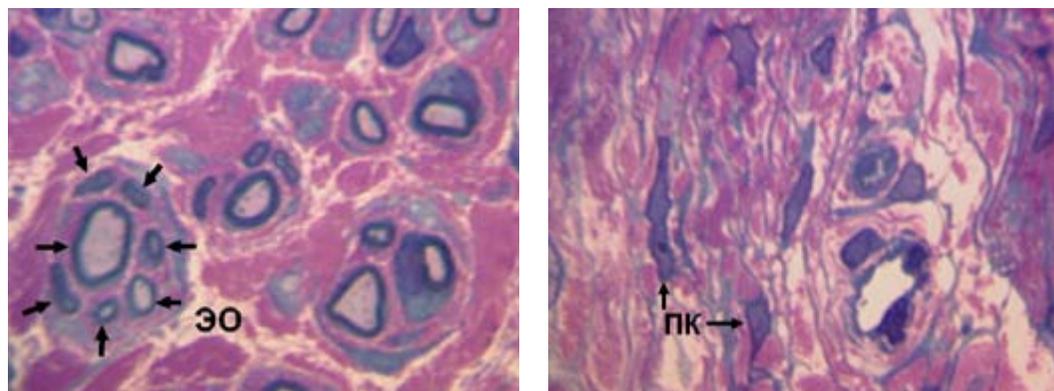


Рис. 4. Поверхностный малоберцовый нерв. Конец периода фиксации (50 суток опыта). а – нервные волокна. ЭО – эндоневральный отек, стрелки – миелинизирующиеся аксоны в составе регенерационного кластера; б – периневрий. ПК – периневральные клетки. Поперечный полутонкий срез, окраска метиленовым синим и основным фуксином. Увеличение 1250х.

Количество миелиновых волокон с признаками деструктивных изменений даже через 90 суток после снятия аппарата остается повышенным: Deg% в 2,4 раза превышает интактный показатель. NA_{mf} и NA_{amf} (24574 ± 380 и 15440 ± 1292) снижаются: NA_{amf} приближается к норме, а NA_{mf} на 13,2% превышает ($p < 0,01$) значения интактного нерва.

В суставном хряще к концу периода фиксации на всех сроках при светооптическом исследовании выявлены очаги разволокнения, демаскировка коллагеновых волокон, формирование узур (рис. 5). В части наблюдений в глубокой зоне отсутствовало колончатое расположение клеток, в отдельных участках наблюдалось истончение зоны кальцифицированного хряща, отмечено проникновение сосудов в хрящ. Толщина (h) хряща снижена ($p < 0,001$) – $400,3 \pm 4,9$ мкм (норма – $475,5 \pm 1,3$ мкм). За счет высокой клеточной плотности в поверхностной зоне численная плотность хондроцитов ($NA_{хц}$) превышала норму ($6,1 \pm 0,7$) до $9,2 \pm 0,7$ в $0,01 \text{ мм}^2$. Отмечены клетки, находящиеся в состоянии деструкции, пустые клеточные лакуны, их доля ($NA_{пуст\ лак}$) составила 17,2%.

Через 30 суток после снятия аппарата деструктивные изменения, как и на предыдущем сроке, выражались разволокнением межклеточного вещества поверхностной зоны, гибелью клеток. Толщина хряща и $NA_{хц}$ снижались ($p < 0,05$) до $372,2 \pm 2,5$ мкм и $7,2 \pm 0,6$, соответственно, $NA_{пуст\ лак}$ составила 26,6%. Часть клеток, входящих в состав изогенных групп, находилась в состоянии деструкции. Численная плотность изогенных групп ($NA_{из. гр}$) сопоставима с нормой.

Через 90 суток после снятия аппарата отмечен прирост h хряща – $452,3 \pm 7,6$ мкм, относительно нормы сохранялись сниженные значения. В части наблюдений восстанавливалась однородность межклеточного вещества поверхностной зоны. Значения численной плотности хондроцитов приближались к норме. $NA_{пуст\ лак}$ и $NA_{из. гр}$ превышали норму – 18% и 20%, соответственно.

В исследованной модели оскольчатого перелома голени у собак признаки механического повреждения передней большеберцовой артерии выявлены в 22,2% опытов, повреждения малоберцового

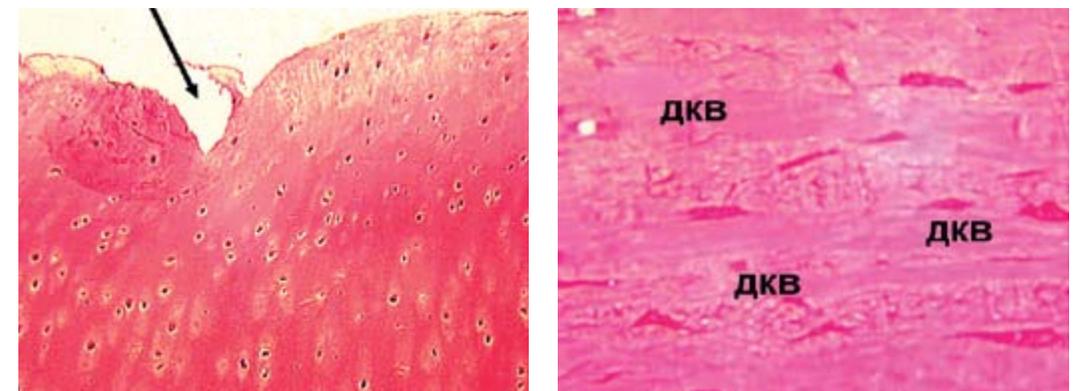


Рис. 5. Поверхностная зона суставного хряща. Конец периода фиксации. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим и основным фуксином; а – разволокнение суставной поверхности, формирование узур (стрелка). Увеличение 200х; б – нарушена однородность межклеточного вещества, демаскировка коллагеновых волокон (ДКВ). Увеличение 500х.

нерва – в 11,1% случаев. Кроме того, в 22,2% опытов имелись гистологические признаки синдрома хронического сдавления передней большеберцовой артерии.

Во всех опытах наблюдались выраженные гемодинамические повреждения, репаративные реакции и адаптационное ремоделирование в передней большеберцовой артерии не только оперированной, но и контралатеральной конечности, а также бедренных артерий.

Хорошо известно, что артерии меняют (ремоделируют) свою структуру при изменениях кровотока [14]; ключевое событие ремоделирования в условиях повышенного кровотока – формирование дефектов внутренней эластической мембраны, которое позволяет артерии увеличить свой калибр и просвет, описано в экспериментах с артерио-венозными фистулами, но не исследовалось при переломах костей. Обнаруженное в данном исследовании разрушение не только внутренней эластической мембраны, но и эластических волокон меди и адвентиции, субинтимальный фиброз, формирование псевдо- и неоинтимы, запустевание меди при прочих неблагоприятных факторах могут инициировать развитие аневризм и системных сосудистых заболеваний или усугубить течение уже имеющихся, несмотря на то, что все описанные изменения имеют адаптационный характер.

Даже в отсутствии признаков механического повреждения малоберцовой нерва были выражены реактивные изменения эпинеургии: его утолщение, инфильтрация клетками воспалительного ряда, формирование коллагеновых депозитов, дистрофические и деструктивные изменения эпинеуральных сосудов, эпинеуральная гиперваскуляризация. Прослежены выраженные изменения клеточных

и волокнистых компонентов перинеурия, аналогичные описанным при дистракционном остеосинтезе у собак [12]. В комплексе эти данные свидетельствуют об усилении структурно-функциональных характеристик перинеурального барьера [11] и гистогенезе структур, обеспечивающих механическую прочность нерва и поддержание гомеостаза среды микроокружения нервных волокон, что объясняет хорошую сохранность проводниковой части нерва при развитии посттравматического отёчно-воспалительного синдрома, прослеженную в выполненном исследовании. К компенсаторно-приспособительным механизмам, направленным на поддержание гомеостаза и регуляцию репаративных процессов, следует отнести также эпинеуральную и эндоневральную гиперваскуляризацию, а также увеличение численности нервных волокон. Аналогичные изменения выявлены в нервах седалищно-берцового комплекса при дистракционном остеосинтезе бедра и голени у собак [1, 3, 9].

В суставном хряще обнаружены деструктивные изменения, выражающиеся разволокнением межклеточного вещества поверхностной зоны, гибелью части хондроцитов, снижением толщины хряща, численной плотности хондроцитов. Эти изменения являются следствием нарушения обменных процессов в суставном хряще, свидетельствующих о снижении синтеза и преобладании катаболических процессов. Через 90 суток после снятия аппарата возврат к двигательному стереотипу способствовал восстановлению гомогенности межклеточного вещества поверхностной зоны хряща только в части наблюдений. В основном, репаративная регенерация суставного хряща имела незавершенный характер, по сравнению с интактной нор-

мой значения морфометрических параметров оставались сниженными.

Выводы

При лечении оскольчатых переломов костей голени, даже на фоне созданных благоприятных биомеханических условий (чрескостный остеосинтез по Илизарову), в передней большеберцовой артерии, малоберцовой нерве и суставном хряще выявлены изменения деструктивно-репаративного и компенсаторно-приспособительного характера.

Полученные экспериментальные данные послужат теоретической основой для разработки эффективных методов поддерживающей терапии и функциональной реабилитации пострадавших с переломами костей.

Список литературы

1. **Варсегова Т.Н.** Методические особенности гистоморфометрии и стереологического анализа периферических нервов в экспериментальных исследованиях // Гений ортопедии. 2006. № 3. С. 90-95.
2. **Варсегова Т.Н.** Морфологическая и морфометрическая характеристика берцовых нервов собак // Сб. науч. тр. по материалам Первых международных Беккеровских чтений. Волгоград. 2010. Ч. 1. С. 317-319.
3. **Варсегова Т.Н.** Реактивно-деструктивные изменения большеберцовой нерва при удлинении голени дробной и высокодетальной дистракцией в эксперименте // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2011. № 4 (80). С. 234-238.
4. **Гайдышев И.П.** Анализ и обработка данных: специальный справочник. – СПб.: Питер. 2001. 752 с.
5. **Камерин В.К., Дьячков А.Н., Мартель И.И.** Монолокальный компрессионно-дистракционный остеосинтез по Или-

зарову в лечении открытых переломов // Гений ортопедии. 1995. № 1. С. 42-45.

6. **Ступина Т.А., Щудло М.М.** Гистоморфометрические характеристики интактного суставного хряща наружного мыщелка бедра собак // Морфологические ведомости. 2008. № 1-2. С. 104-107.

7. **Ступина Т.А., Щудло М.М.** Способ количественной оценки состояния суставного хряща на разных уровнях структурной организации // Гений ортопедии. 2009. № 1. С. 55-57.

8. **Швед С.И., Мартель И.И.** Чрескостный остеосинтез в лечении открытых переломов конечностей // Гений ортопедии. 1996. № 2-3. С. 102-103.

9. **Шевцов В.И., Щудло Н.А., Щудло М.М.** Изменения численно-размерного состава и динамического состояния нервных волокон седалищного нерва при удлинении бедра у собак // Гений ортопедии. 2004. № 1. С. 39-44.

10. **Щудло М.М., Варсегова Т.Н., Ступина Т.А., Борисова И.В., Гордичук С.В., Воинкова Л.В., Кобелев А.В.** Проблема эффекта Холмса в количественной телепатологии (методические аспекты) // Известия Челябинского Центра УРО РАН. 2003. № 1. С. 120-124.

11. **Щудло М.М.** Морфологические эквиваленты физиологических барьеров нервных стволов // Российские морфологические ведомости. 1999. №1-2. 172 с.

12. **Щудло М.М.** Рост и дифференцировка структур эпи-перинеурия в условиях дозированного растяжения // Вестник РАМН. 2000. № 2. С.19-23.

13. **Щудло М.М., Ступина Т.А., Щудло Н.А.** Количественный анализ метахромазии суставного хряща в телепатологии // Известия Челябинского ЦНЦ (УРО РАН). Специальный выпуск (25). 2004. С. 17-22. http://csc.ac.ru/news/2004_special/04.zip

14. *Masuda H., Zhuang Y.J., Singh T.M., Kawamura K., Murakami M., Zarins C.K., Glagov S.* Adaptive Remodeling of Internal Elastic Lamina and Endothelial Lining During Flow-Induced Arterial Enlargement // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999. V. 19. P. 2298-2307.
15. *McQueen M.M., Christie J., Court-Brown C.M.* Acute compartment syndrome in tibial diaphyseal fractures // *Bone Joint Surg [Br]*. 1996. 78-B. P. 95-98.
16. *Miki R.A., Lawrence J.P., Gillon T.J., Lawrence B.D., Zell R.A.* Anterior tibial artery and deep peroneal nerve entrapment in spiral distal third tibia fracture // *Trauma Orthopaedics*. 2008. V. 31. № 12. 1240 p.
17. *Miller N.C., Askew A.E.* Tibia fractures: an overview of evaluation and treatment // *Orthopaedic Nursing*. 2007. V. 26. № 4. P. 216-223.
18. *Mirdad T. M.* Neuro-vascular injuries associated with limb fractures // *East African Medical Journal*. 2000. V. 77. № 12. P. 663-665.
19. *Wani N., Baba A., Kangoo K., Mir M.* Role of early Ilizarov ring fixator in the definitive management of type II, IIIA and IIIB open tibial shaft fractures // *International Orthopaedics*. 2011. V. 35. № 6. P. 915-923.

Structural reorganization of femoral and tibial arteries, peroneal nerve, and the knee cartilage for experimental canine leg bone fractures and their treatment by transosseous osteosynthesis technique

N.A. Chtchoudlo, T.N. Varsegova, T.A. Stupina, I.V. Borisova

Comminuted leg fractures were modeled in 18 adult mongrel dogs. A complex histological study was performed using computer morphometry of the femoral and anterior tibial arteries, the superficial peroneal nerve, the knee cartilage in different periods of leg fixation by the Ilizarov device (days 14, 21, 35-37 and 48-50), 30 and 90 days after the device removal (80 and 140 days of experiment, respectively). The signs of the anterior tibial artery mechanical injury have been revealed in 22,2% of experiments, those of the peroneal nerve injuries – in 11,1% of cases. The dynamics of changes in the medium diameter of the anterior tibial artery of the limb operated, lumen diameter and its wall thickness has been established to depend on osteogenesis intensity. The increase of the absolute value of morphometric parameters has been noted in animals with accelerated fracture consolidation (35-37 days), in case of the device fixation for 48-50 days all the morphometric parameters have had the tendency towards increasing in comparison with fixation for the period of 14-21 days. The increase of arterial calibre and lumen was accompanied by the formation of the defects of the inner elastic membrane the length of which in cross sections exceeded 30% of luminal surface perimeter. In the experiments with the absence of the signs of peroneal nerve mechanical injury the changes in epineurium and perineurium have been revealed evidencing the intensification of the structural-and-functional characteristics of the perineural barrier, as well as histogenesis of the structures providing the nerve mechanic strength and the maintenance of homeostasis of nerve fiber microenvironment medium. The destructive changes have been revealed in the articular cartilage expressed as follows: the visualization of the superficial zone extracellular substance gametting, the death of a part of chondrocytes, the decrease of cartilage thickness and chondrocyte numerical density. The reparative regeneration of the cartilage was of incomplete for up to 140 days of the experiment. The experimental data obtained are required for developing the effective methods of supporting therapy and functional rehabilitation of casualties with bone fractures.

Key words: fractures, remodeling of arteries, regeneration of nerves and cartilage.

Влияние эмоксипина на морфометрические показатели щитовидной железы белых крыс в постнатальном онтогенезе в условиях иммобилизационного стресса

А.Л. Ясенявская, С.А. Лужнова

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия», Астрахань

Контактная информация: Ясенявская Анна Леонидовна yasen_9@mail.ru

Изучали влияние эмоксипина на структуру щитовидной железы белых крыс в молодом и зрелом возрасте на фоне иммобилизационного стресса.

В результате исследования было установлено, что эмоксипин устранял изменения в структуре щитовидной железы, проявляющиеся снижением высоты тироцитов и площади ядер тироцитов, а также увеличением площади фолликулов и фолликулярного коллоида.

Ключевые слова: щитовидная железа, эмоксипин, иммобилизационный стресс.

Стресс, как известно, представляет собой совокупность защитных и повреждающих реакций организма, возникающих в результате нейроэндокринных и метаболических сдвигов в ответ на действие чрезвычайных или патологических факторов. Стрессорные факторы, действующие на организм, вызывают в нем цепь защитно-приспособительных реакций, заключающихся в изменении нейроэндокринных, иммунных, метаболических и других процессов [1, 2, 3, 5, 6, 11, 12, 15].

Адаптационные возможности различаются у животных разного возраста, так как в процессе онтогенеза происходит формирование и становление механизмов адаптации [13, 14]. С возрастом активность окислительного метаболизма изменяется, и его степень обратно пропорциональна продолжительности жизни для различных видов животных [7]. Нарушение баланса про- и антиоксидантных процессов в ходе возрастной инво-

люции играет немалую роль в развитии возраст-зависимой патологии, а также при физиологических факторах, близких к экстремальным [9, 10]. В этих условиях активация свободнорадикальных процессов коррелирует со снижением эффективности функционирования биологических систем и утилизации свободных радикалов [8].

Принимая во внимание тот факт, что щитовидная железа является одним из ключевых звеньев нейроэндокринной системы «гипоталамус – гипофиз – железы – мишени», исследования, посвященные изучению механизмов взаимосвязи тиреоидной функции и свободнорадикальных процессов, несомненно, актуальны.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния эмоксипина на морфометрические показатели функциональной активности щитовидной железы на разных этапах постнатального онтогенеза в условиях иммобилизационного стресса.

Материалы и методы

Исследование проведено на 110 белых беспородных крысах-самцах, полученных из питомника лаборатории экспериментальной физиологии Астраханского государственного университета. Эксперимент проводили в 2 серии: в 1-ой серии эксперимента использовали молодых животных, массой 75-100 г., во 2-ой – старых крыс, массой 260-300 г. Манипуляции с животными проводили в весенне-летний период. Крыс содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении. Все животные были синхронизированы по питанию при свободном доступе к воде.

В каждой серии экспериментов животных делили на группы по 7-10 особей:

1-ю группу составляли контрольные крысы, получавшие в качестве «плацебо» дистиллированную воду;

2-ю группу – крысы, подвергнутые воздействию иммобилизационного стресса;

3-ю группу – животные, получавшие 1% раствор эмоксипина («Московский эндокринный завод») в дозе 0,5 мг/100 г внутримышечно в течение 14 дней.

4-ю группу – крысы, получавшие 1% раствор эмоксипина («Московский эндокринный завод») в дозе 0,5 мг/100 г внутримышечно с 1-го дня эксперимента и подвергавшиеся воздействию иммобилизационного стресса с 8-х суток эксперимента.

Иммобилизационный (гипокинетический) стресс моделировали, помещая животное ежедневно в пластиковую камеру, ограничивающую их движения в течение 2-х ч при комнатной температуре. Животные подвергались стрессированию в течение 7 дней, начиная с 8-го дня эксперимента. По окончании опытов предварительно наркотизированных вну-

трибрюшинным введением этиаминала натрия (4 мг/100 г) животных декапитировали, щитовидную железу фиксировали в смеси Буэна, после чего заливали в парафин. Серии фронтальных срезов окрашивали по методу Ван-Гизона [11].

В качестве морфометрических показателей для изучения функционального состояния щитовидной железы были исследованы:

1) высота тиреоидного эпителия – классический и наиболее чувствительный показатель секреторной активности щитовидной железы;

2) площадь ядра – показатель, отражающий биосинтетическую (гормонопродуцирующую) тиреоидную функцию;

3) площадь фолликулов как интегральный показатель морфофункционального состояния железы;

4) площадь фолликулярного коллоида, характеризующая состояние резерва гормональных веществ.

Результаты обрабатывали статистически с использованием алгоритма для определения средней арифметической, ее ошибки и достоверности различия между средними сопоставляемых групп с помощью критерия t-Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений [4].

Результаты и их обсуждение

Анализ полученных данных показал, что на фоне введения молодым животным эмоксипина наблюдалось статистически значимое увеличение высоты тироцитов и площади ядер ($p < 0,05$), при статистически недостоверном снижении площади фолликулов и фолликулярного коллоида (табл. 1). Также как и у молодых животных, у старых крыс-самцов под влиянием эмоксипина наблюдалось статистически значимое увеличение вы-

соты тироцитов ($p < 0,01$) и площади их ядер ($p > 0,05$). Площадь фолликулов и фолликулярного коллоида уменьшалась, но данные изменения не являлись статистически значимыми (табл. 2).

В условиях иммобилизационного стресса у молодых и старых крыс-сам-

цов наблюдались сопоставимые изменения указанных выше морфометрических параметров щитовидной железы: снижались высота ($p < 0,05$) и площадь тироцитов ($p < 0,05$); в то время как площадь фолликулов и фолликулярного коллоида увеличивалась ($p > 0,05$) (табл. 1, 2).

Таблица 1

Изменения морфометрических показателей щитовидной железы молодых крыс-самцов при различных видах воздействия

Экспериментальные группы	Морфометрические показатели			
	Высота тироцитов, М±m, мкм	Площадь ядер тироцитов, М±m, мкм ²	Площадь фолликулов, М±m, мкм ²	Площадь фолликулярного коллоида, М±m, мкм ²
Контроль	8,9±0,2	17,2±0,5	3700,2±218,8	1719,8±143,4
Эмоксипин (0,5 мг/г)	11,5±0,8*	22,1±1,8*	3535,8±244,4	1313,9±134,1
Стресс	7,6±0,5*	15,5±0,3*	4280,1±195,3	2050,3±107,9
Эмоксипин (0,5 мг/г)+ Стресс	9,6±0,2* ##	20,2±0,5 ** ##	3624,9±232,8 #	1419,8±192,2 #

Примечание:

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ по сравнению со стрессом.

Таблица 2

Изменения морфометрических показателей щитовидной железы старых самцов крыс при различных видах воздействия

Экспериментальные группы	Морфометрические показатели			
	Высота тироцитов, М±m, мкм	Площадь ядер тироцитов, М±m, мкм ²	Площадь фолликулов, М±m, мкм ²	Площадь фолликулярного коллоида, М±m, мкм ²
Контроль	7,6±0,4	20,1±0,7	3800,1±194,5	1884,0±138,6
Эмоксипин (0,5 мг/г)	10,3±0,7 **	20,2±0,3	3508,5±271,9	1441,4±153,6
Стресс	6,6±0,3 *	17,6±0,2 *	4159,3±152,8	2148,6±180,0
Эмоксипин (0,5 мг/г) + Стресс	9,2±0,2 **###	19,6±0,4	3661,2±198,2	1660,9±178,1

Примечание:

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ по сравнению со стрессом.

Применение эмоксипина с целью возможной коррекции развивающихся нарушений в структуре щитовидной железы стрессированным молодым самцам сопровождалось повышением высоты тироцитов и увеличением площади ядер тироцитов как в сравнении с крысами, подвергшимися иммобилизационному стрессу ($p < 0,01$), так и с интактными животными ($p < 0,05$). Площадь фолликулов и фолликулярного коллоида была статистически достоверно меньше таковой у стрессированных молодых животных ($p < 0,05$), относительно значений у крыс контрольной группы данные показатели были ниже, но статистической значимости не имели (табл. 1).

Введение эмоксипина старым животным, подвергшимся воздействию стресса, сопровождалось аналогичными по сравнению с группой молодых животных изменениями указанных выше морфометрических параметров щитовидной железы. Наблюдалось увеличение высоты тироцитов как у относительно стрессированных животных ($p < 0,001$), так и у контрольных крыс ($p < 0,01$). Площадь ядер тироцитов увеличивалась по отношению к показателям у животных, подвергшихся иммобилизационному стрессу, и была сопоставима с контролем (достоверных отличий не наблюдали). Площадь фолликулов и фолликулярного коллоида под влиянием изучаемого препарата снижалась по сравнению как с контрольными, так и со стрессированными крысами. Изменения данных показателей не являлись статистически достоверными.

Таким образом, анализ полученных данных позволил выявить усиление функциональной активности щитовидной железы при действии эмоксипина. Экспериментально вызванный гипокINETический стресс независимо от возрас-

та животных ослабил функциональную активность щитовидной железы, вызвав уменьшение размеров ядер, что свидетельствует, вероятно, об ослаблении транскрипционной и, соответственно, биосинтетической активности железы. Наблюдаемое при стрессе увеличение размеров фолликулов произошло, вероятно, за счет ослабления процессов реабсорбции. Обнаружено модифицирующее действие эмоксипина на фоне гипокINETического стресса: под влиянием изучаемого антиоксиданта высота тироцитов, площадь ядер, площадь фолликулов и фолликулярного коллоида приближаются к контрольным значениям. Отмечая выраженный стресс-протекторный эффект эмоксипина в наших опытах, следует подчеркнуть отсутствие каких-либо заметных возрастных отличий этого показателя у экспериментальных крыс.

Список литературы

1. **Александрова Н.В., Замышляев А.В.** Влияние интервальной гипоксической тренировки на состояние эндокринных желез // Вестник новгородского гос. Университета. 2006. № 35. С. 40-41.
2. **Баженев Ю.И., Баженова А.Ф., Горбачева Л.Р.** Физиологические механизмы адаптации к холоду // Бюллетень СО РАМН, приложение. – Материалы конгресса по приполярной медицине. Новосибирск. 2006. 20 с.
3. **Божко А.П., Городецкая И.В.** Значение тиреоидных гормонов организма в реализации защитных эффектов холодовой адаптации // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1994. № 3. С. 29-32.
4. **Гланц С.** Медико-биологическая статистика – М.: Практика. 1999. 459 с.
5. **Држевецкая И.А.** Основы физиологии обмена веществ и эндокринной системы: учебное пособие для биологи-

ческих и медицинских спец. вузов. 3-е издание, переработанное и дополненное. М.: Высшая школа. 1994. 256 с.

6. **Козырева Т.В.** Центральные и периферические терморцепторы. Сравнительный анализ влияния длительной адаптации организма к холоду и норадреналину // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2005. Т. 91. № 12. С. 1492-1503.

7. **Коркушко О.В., Чебаторева Д.Ф., Калиновская Е.Г.** Гериатрия с терапевтической практикой. – Киев: Здоров'я. 1993. 830 с.

8. **Ланкин В.З., Тухазе А.К., Беленков Ю.Н.** Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: pro et contra. М.: Медпрактика. 2003. 83 с.

9. **Лишневецка В.Ю.** Реологични властивости крови в осиб похилого веку, хворих на ІХС // Буковиньски медичний весник. 2002. Т. 6. № 4. С. 93-96.

10. **Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь П.А., Круговых Н.Ф., Труфанкин В.А.** Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово. 2006. 553 с.

11. **Розен В.Б.** Основы эндокринологии – М.: МГУ. 1994. 384 с.

12. **Ромейс Б.** Микроскопическая техника [пер. с нем. В. Александров] – М.: Издательство иностранной литературы. 1953. 718 с.

13. **Тодоров И. Н., Тодоров Г.И.** Стресс и старение и их биохимическая коррекция. – М.: Наука. 2003. 249 с.

14. **Ravi Kiran T., Subramanyam M.V., Prathima S., Asha Devi S.** Blood lipid profile and myocardial superoxide dismutase in swim-trained young and middle-aged rats: comparison between left and right ventricular adaptations to oxidative stress // J. Comp Physiol B. 2006. V.176(8). P. 749-762.

15. **Hangalapura, B.N., Nieuwland M.G., Buysse J., Kemp B., Parmentier H.K.** Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune responses in chicken lines divergently selected for antibody responses // Poult Sci. 2004. V. 83 (10). P. 1644-1649.

The influence of the emoxipine on morphometric index of the thyroid gland of the white rats in the postnatal ontogenesis under immobilization stress

A.L. Yasenyavskaya, S.A. Lugnova

The influence of emoxipine on the structure of the thyroid gland of the young and old white rats under immobilization stress is investigated.

The study found that emoxipine eliminated changes in the structure of the thyroid gland the height of the thyroid epithelial cells and the area of the nucleus were increased, the area of the follicles and the area of the follicular colloid were decrease.

Key words: the thyroid gland, emoxipine, the immobilization stress.



Новые специализированные линии и семейства лабораторных мини-свиней

Н.В. Станкова, Г.Д. Капанадзе

ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, Московская область

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

Описаны линии и семейства существующей популяции светлогорских мини-свиней, основные их характеристики и особенности.

Ключевые слова: светлогорские мини-свиньи, разведение.

В нашем Центре в лаборатории биомедицины и экспериментальной хирургии непрерывно ведутся исследования в области стоматологии, фармакологии, токсикологии и др., где объектом исследования служат светлогорские мини-свиньи. Они успешно зарекомендовали себя во многих областях науки как адекватные биомодели, и спрос на них постоянно растет. С нами сотрудничают многие институты, научные центры и различные лаборатории, эксперименты проводят студенты-практиканты, молодые ученые, доктора, профессора и т. д. Наша основная цель и задача – обеспечить экспериментаторов соответствующим поголовьем животных определенного возраста и пола. Для этого мы применяем классический метод чистопородного разведения – разведение по линиям.

Материалы и методы

В прошлых работах по данной тема-

тике мы рассказывали об истории создания, становления и усовершенствования светлогорской популяции мини-свиней [1, 3, 5]. Приводили основные показатели роста и развития, продуктивности, иммунологических характеристик [2, 4, 6, 7]. Здесь мы описываем не так давно начатое разведение по линиям и некоторые особенности линий и семейств.

Результаты и их обсуждение

Светлогорские мини-свиньи содержатся в оборудованном виварии с оптимальными условиями кормления, позволяющем содержать определенное количество животных. В этих условиях мы размещаем пользовательскую группу – животные, которые участвуют в экспериментах, и племенную группу – животные, которые используются в разведении. В настоящее время в светлогорской популяции мини-свиней ведется чистопородное разведение по линиям. Такое

разведение позволяет расчлнить популяцию (зональный тип) на отдельные неродственные между собой группы животных и спланировать подбор так, чтобы исключить случайное родственное спаривание. Все животные были объединены в 4 линии и 2 семейства на основе неродственного спаривания, и теперь возможно применение только дальнего родственного спаривания, не ведущего к существенному возрастанию гомозиготности (типа III-III, III-IV, IV-IV). На данном этапе селекционной работы каждая линия представляет собой группу животных-потомков родоначальника, который не являлся выдающимся, и связанных с ним по прямой правой (мужской) стороне родословной. Селекция отцовских форм ведется по экстерьеру, стрессчувствительности, качеству потомства и воспроизводительной способности. Материнских форм – по многоплодию, молочности, сохранности и выравненности поросят в гнезде. Мини-свиньи всех линий используются в экспериментах, лишь самые выдающиеся животные используются в племенной работе и не участвуют в экспериментах. Эти животные постоянно проверяются по качеству потомства и проходят бонитировку, они

имеют сниженную живую массу, крепкую конституцию и уравновешенный темперамент. От них мы постоянно получаем потомство, которое систематически заменяет и/или обновляет животных пользовательской группы.

СМС – линия животных, которая была создана на основе собственного генофонда, животные объединены лишь формально, только по общности происхождения. Это самая многочисленная и основная группа животных, для которых характерна крепкая конституция, уравновешенный темперамент и самые разнообразные масти (рис. 1). Живая масса при рождении составляет 0,6 кг; в возрасте 1 год – 25-30 кг; многоплодие свиноматок – 8 гол.; сохранность поросят к отъему – 90%.

Линии Ст, Вс, С3 были созданы при использовании 3 хряков-родоначальников. Это потомки одного родоначальника, еще должным образом не отработанные по качеству, но уже имеющие некоторые характерные особенности: Ст и С3 – сниженная живая масса, животные в возрасте 1 год имеют живую массу 25,5 и 25,3 кг соответственно; Вс – белая масть, это необходимый критерий при экспериментах на коже. На данном этапе



а



б

Рис. 1. Животные линии СМС: а – свиноматка; б – хряк.



а б
Рис. 2. Животные линии Ст: а – свиноматка; б – хряк.



а б
Рис. 3. Животные линии Vc: а – свиноматка; б – хряк.



а б
Рис. 4. Животные линии C3: а – свиноматка; б – хряк.

селекционной работы с этими линиями уже получены хорошие показатели по живой массе, стрессустойчивости и экстерьеру среди потомков (рис. 2, 3, 4).

Семейства С8 и С22 были созданы при использовании 2 свиноматок-родоначальниц (рис. 5, 6). Это животные, обладающие повышенным многоплодием, – 8,5-9 гол., высокой сохранностью поросят – 97% и хорошими материнскими качествами.

Эти характеристики имеют чисто зоотехнический характер (живая масса, масть, экстерьер), в экспериментах принимают участие животные вне зависимости от линейной принадлежности. Мы используем разведение по линиям во избежание вырождения популяции в целом, для получения не родственных животных в условиях, позволяющих содержать ограниченное поголовье. Этот метод позволяет достаточно долго раз-



а б
Рис. 5. Животные семейства С8: а – поросята-отъемыши; б – хряк.



а б
Рис. 6. Животные семейства С22: а – свиноматка; б – хряк.

Заключение

Таким образом, заложены линии животных с определенными характери-

водить животных без привлечения в разведение животных из других хозяйств. Нам важно сохранить популяцию в чи-

стоте, без прилития крови других пород, особенно зарубежных. Накоплен определенный объем показателей по потомству в каждой линии, что позволит в дальнейшем адекватно выбирать животных-продолжателей линий, а также создавать новые линии на основе кроссов существующих линий.

Список литературы

1. *Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А.* Светлогорская популяция мини-свиней // Биомедицина. № 6. 2007. С. 70-80.
2. *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.
3. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в

биомедицинских исследованиях / под редакцией Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль 2С. 2010. 358 с.

4. *Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д.* Оптимизация светлогорских мини-свиней для биомедицинских исследований // Биомедицина. 2010. № 5. С. 33-49.
5. *Станкова Н.В., Капанадзе Г.Д.* Селекционно-генетическая и экспериментальная работа с мини-свиньями светлогорской популяции // Биомедицина. № 1. 2012. С. 49-53.
6. *Станкова Н.В.* Типы крови человека и мини-свиней светлогорской популяции // Вестник РАСХН. 2008. № 6. С. 29-30.
7. *Тихонов В.Н.* Лабораторные мини-свиньи: генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск. СО РАН. 2010. 304 с.

New specialized lines and families of laboratory mini-pigs

N.V. Stankova, G.D. Kapanadze

Lines and families of existing population of Svetlogorsk mini-pigs their main characteristics and features are described.

Key words: Svetlogorsk mini-pigs, breeding.



Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей

Сообщение 1: Исследование последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на стадии раннего органогенеза на жизнеспособность эмбрионов у самок крыс и мышей

Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко, Е.Л. Матвеев, Г.Д. Капанадзе

ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, Московская область

Контактная информация: к.б.н. Хызыр Хыйсаевич Семенов schmt@yandex.ru

На крысах низкоустойчивой к гипоксии линии (НУ/У), выведенных и поддерживаемых в НЦБМТ РАМН, и на мышах линии С57BL/6У, поддерживаемых также в коллекционном фонде Центра, исследовали последствия влияния острой гипобарической гипоксии на жизнеспособность эмбрионов. Острому гипоксическому стрессу самок обоих видов подвергали на 10-м дне беременности. В результате проведенного эксперимента установлено, что общая эмбриональная смертность в постимплантационном периоде развития у самок крыс опытной группы была равна 9,5%, у самок мышей – 11,2%. При этом вклад рецессивных леталей в эмбриональную смертность у самок крыс и у самок мышей составил 4,36 и 5,1%, соответственно. Таким образом, доля погибших эмбрионов, обусловленных влиянием гипоксии, равнялась у самок крыс 6,0%, у самок мышей – 6,1%.

Ключевые слова: острая гипобарическая гипоксия, рецессивные летали, мыши, крысы.

Проблема ухудшения здоровья беременных и, как следствие этого, высокий процент перинатальных потерь и патологий дальнейшего развития является одной из наиболее актуальных в современной медицине. Из всех стрессирующих воздействий, которым может быть подвержен зародыш в период внутриутробного развития, гипоксия является наиболее

распространенным и клинически значимым, приводящим к эмбриотоксическим последствиям и различным патологиям развития. В эмбриогенезе человека и животных наиболее уязвимыми периодами являются период имплантации (5-6 дни у крыс и мышей, 6-8 дни у человека) и период раннего органогенеза (9-11 дни у крыс и мышей, 7-21 дни у человека).

Гипоксические состояния на разных стадиях беременности могут нарушать нормальное течение беременности и родов, привести к развитию патологий плода [5]. Результатом внутриутробной гипоксии было снижение численности помета, часть которого оказалась нежизнеспособной из-за выраженной пренатальной гипоксии. Крысята при рождении имели низкую массу тела и надпочечников [1, 2]. Клинические, нейрофизиологические и биохимические исследования показали, что у детей, перенесших гипоксию, нарушено формирование циклической организации сна, ауторегуляции мозгового кровотока, наблюдается отставание на 2-4 неделе от должного развития познотонических реакций и безусловных рефлексов [3]. Гипоксия на стадии органогенеза оказывает в постнатальном периоде развития стойкое влияние на сердечную деятельность, вызывая нарушения вегетативного баланса по данным ЭКГ, частые случаи тахикардии и брадикардии [6]. Гипоксические состояния плода играют существенную роль в нарушении внутриутробного развития и являются ведущим фактором перинатальной заболеваемости. Перенесенная внутриутробная гипоксия всегда оставляет морфологический или функциональный след в центральной нервной системе, который может проявиться в дальнейшей жизни ребенка, вызывая различные психоневрологические расстройства [4].

Влияние острого гипоксического стресса в период раннего органогенеза на исход беременности, т.е. на жизнеспособность эмбрионов, практически не изучено. Поэтому целью настоящей работы была попытка установить величину реальных потерь эмбрионов, обусловленных воздействием острой гипобарической гипоксии на беременных самок

(крыс и мышей) на стадии раннего органогенеза.

Материалы и методы

В эксперименте были использованы крысы низкоустойчивой к гипоксии линии НУ/У, выведенные и поддерживаемые в НЦБМТ РАМН, а также мыши линии С57BL/GY, поддерживаемые в коллекционном фонде. Животные содержались в конвенциональных условиях, в пластмассовых клетках Т2 с автопоилками и получали гранулированный комбикорм фирмы «Лабораторкорм» *ad libitum*. Дополнительно к этому ежедневно им выдавали белково-витаминную подкормку (состав: овсянка, сухое молоко, витамины А, Е, D в масле). Для фиксации точного срока беременности виргинных самок крыс и мышей подсаживали к самцам на ночь (крыс в соотношении 1:1, мышей – 2:1) и утром следующего дня по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке у самок крыс и влагалищных пробок у самок мышей отбирали и вели отсчет срока беременности. Отобранные самки были разделены на группы. Крыс в опытной группе было 70 особей, в контроле – 50 особей. Мышей – 60 и 50 особей, соответственно. Самок опытных групп – как крыс, так и мышей – на 10-й день беременности подвергали воздействию острой гипобарической гипоксии. Моделирование острой гипобарической гипоксии для самок крыс осуществляли в барокамере при разрежении атмосферы в 145 мм рт.ст., что соответствует высоте 11500 м над уровнем моря. Подъем на «высоту» длился 1 мин. У низкоустойчивых животных (выведенных в нашем Центре) время жизни на «высоте» не превышает 60 с, что, естественно, не может являться значимой мерой воздействия, способной оказать существенное

влияние на жизнеспособность развивающегося плода. Поэтому после подъема самки на критическую «высоту» и с момента, когда она начинала биться в агонии, во избежание ее гибели, «опускали» до предельной для нее «высоты» – 9000-9500 м и продолжали подвергать гипоксии, которая длилась 8-10 мин.

Что касается воздействия острой гипобарической гипоксии на самок мышей, то оно отличалось от крыс только тем, что «высота» подъема для них не превышала 8000 м.

Результаты и их обсуждение

В настоящем эксперименте самок крыс и мышей на 10-м дне беременности подвергали воздействию острой гипобарической гипоксии с целью установления ее влияния на жизнеспособность эмбрионов в утробном периоде развития. Результаты проведенного эмбриологического анализа представлены в таблице. У крыс среднее число живых и мертвых эмбрионов на самку в опыте и контроле было $8,57 \pm 0,21$ и $8,60 \pm 0,17$, соответственно. Аналогичные показатели у самок мышей составили $7,45 \pm 0,19$ и $7,44 \pm 0,20$. Практически равные показатели по числу имплантатов у каждого вида свидетельствуют, что подобранные в эксперимент животные-аналоги и условия их содержания идентичны.

Согласно полученным экспериментальным данным, эмбрионная смертность

у самок крыс опытной группы составила, в целом, 9,5% против 3,5% у самок контрольной группы (рис. 1, 2). Следовательно, можно полагать, что разница по уровню эмбриональной смертности у самок опытной и контрольной групп была обусловлена влиянием острой гипобарической гипоксии на стадии раннего органогенеза. Однако более детальный анализ нежизнеспособности эмбрионов показал, что они четко различаются по срокам гибели (о чем свидетельствуют их размеры). Часть из них, что соответствует 4,36%, не доживали до 10 дня развития (рис. 2а, 3). Таким образом, они не могли стать жертвами гипоксического стресса. Из этого следует, что 4,36% постимплантационной эмбриональной смертности обусловлены рецессивными летальными.

У самок мышей опытной группы вклад рецессивных деталей в эмбриональную смертность составил 5,1%. Если учесть, что смерть эмбрионов, обусловленная рецессивными летальными, может произойти на любой стадии утробного развития, то определенная доля из них включена в число погибших от гипоксии. Следовательно, вклад рецессивных леталей в постимплантационную эмбриональную смертность у крыс и мышей несколько занижен, а показатели уровня смертности эмбрионов под влиянием гипоксического стресса, соответственно, завышены.

Реальные данные могут быть получены только методом цитогенетического



Рис. 1. Нормальные десятидневные эмбрионы (контроль).

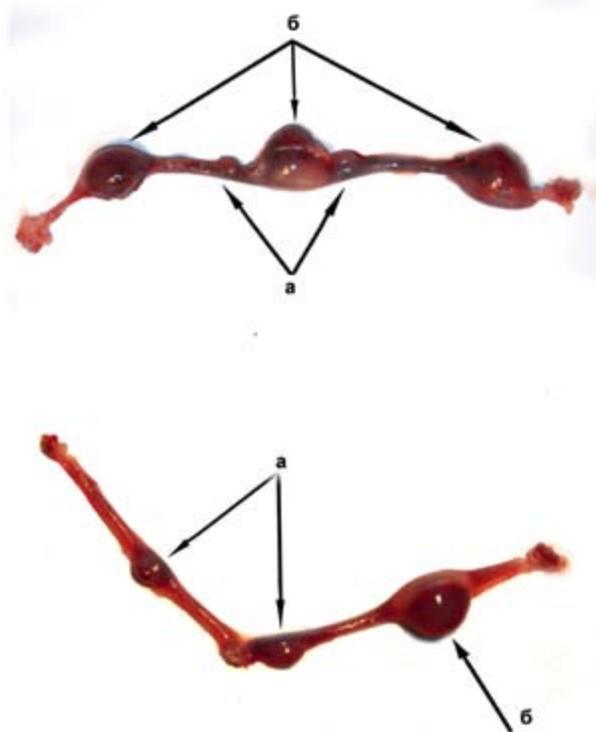


Рис. 2. Эмбрионы девятнадцатого дня развития: а – рецессивные летали; б – эмбрионы, погибшие под воздействием гипоксического стресса.



Рис. 3. Эмбрионы двадцатого дня развития: слева – жертва гипоксии; справа – нормально развитый.

Результаты вскрытия самок лабораторных крыс и мышей на 20-21-й дни беременности после воздействия острой гипобарической гипоксии на стадии раннего органогенеза (10-й день развития эмбриона)

Показатель	Крысы		Мыши	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
Число самок	70	50	60	50
Число мест имплантации	600	430	447	372
Число живых эмбрионов	543	415	397	354
Число мертвых эмбрионов				
Всего (число)	57	15	50	18
%	9,5	3,5	11,2	4,9
в т.ч. вклад				
число	21	15	23	18
%	4,36	3,5	5,1	49,1
в т.ч. погибло от гипоксии				
число	36	—	27	—
%	6,0	—	6,1	—

анализа. Таким образом, уровень эмбриональной смертности, обусловленной влиянием острой гипобарической гипоксии на стадии раннего органогенеза, составил у самок опытной группы крыс около 6,0%, у самок мышей – 6,1%.

Выводы

1. Проведенное исследование показало: 1. Общий уровень эмбриональной смертности у самок крыс опытной группы составил 9,5%, у самок мышей – 11,2%.
2. Постимплантационная смертность у самок контрольных групп крыс и мышей была равна 3,5 и 4,9%, соответственно.

3. Эмбриональная смертность, обусловленная влиянием острого гипоксического стресса, у самок крыс составила 6,0%.

4. Вклад рецессивных леталей в постимплантационную эмбриональную смертность у тех же самок крыс равнялся 4,36%.

5. У самок мышей опытной группы были получены аналогичные показатели: 6,1 и 5,1%, соответственно.

Отсюда следует, что исследуемые близкие виды грызунов проявили практически одинаковую чувствительность на воздействие острой гипобарической гипоксии.

Список литературы

1. Баранов Э.Ф., Сулаева О.Н., Черешнева Е.В. Пренатальный гипоксический стресс: влияние на морфогенез надпочечников // Материалы 4-й Российской конференции «Гипоксия, механизмы адаптации, коррекция». М. 2005. 10 с.
2. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И. Особенности поведения крыс после действия умеренной и тяжелой гипоксии в различные сроки пренатального органогенеза // Материалы 4-й Российской конференции «Гипоксия, механизмы адаптации, коррекция». М. 2005. 20 с.
3. Евсюкова И.И. Новые аспекты патогенеза нарушений развития функций ЦНС у новорожденных детей, перенесших хроническую гипоксию // Материалы 4-й Российской конференции «Гипоксия, механизмы адаптации, коррекция». М. 2005. 41 с.
4. Кривоногова Т.С., Тропова Т.Е., Гладких Л.К., Гареев В.В., Гергет О.М. Комплексный подход к лечению внутриутробной гипоксии плода // Материалы 4-й Российской конференции «Гипоксия, механизмы адаптации, коррекция». М. 2005. 60 с.
5. Крушинская Я.В., Маслова М.В., Граф А.В., Соколова Н.А. Изменение показателей ЭКГ беременных самок крыс при острой гипобарической гипоксии // Материалы 4-й Российской конференции «Гипоксия, механизмы адаптации, коррекция». М. 2005. 61 с.
6. Неверова М.Е., Мкртумова Н.А., Фиделина О.В., Маслова М.В., Соколова Н.А., Калинин В.Н. Пренатальная гипоксия как экспериментальная модель для изучения терапевтического эффекта рекомбинантного «гена» брадикинина в системе *in vitro* // Материалы 4-й Российской конференции «Гипоксия, механизмы адаптации, коррекция». М. 2005. 83 с.

Influence of acute hypobaric hypoxia on reproductive function of laboratory rats and mice

Message 1: Research of consequences of influence of acute hypobaric hypoxia at a stage early organogenesis on viability of embryos at females of rats and mice

H.H. Semenov, N.N. Karkischenko, E.L. Matveenko, G.D. Kapanadze

On rats from the strain (HY/Y) low-steady against a hypoxia, deduced and supported in SCBMT of RAMS and on the mice strain C57BL/6Y supported also in collection fund of the Center, investigated consequences of influence of a sharp hypobaric hypoxia on viability of embryos. To acute hypoxia stress of females of both types subjected at the 10th bottom of pregnancy. As a result of the carried-out experiment it is established that the general embryonic mortality was equal in the postimplantation period of development in females of rats of skilled group of 9,5%, at females of mice – 11,2%. Thus the contribution recessive lethal in embryonic mortality at females of rats and at females of mice made 4,36 and 5,1%, respectively. Thus, the share of the lost embryos caused by influence of a hypoxia, equaled at females of rats of 6,0%, at females of mice – 6,1%.

Key words: acute hypobaric hypoxia, recessive lethal, mice, rats.



КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Фармакокинетика и клиническая эффективность гипополидемического препарата Аторвастатина

А.С. Сивков, С.К. Сивкова, В.Г. Кулес, Г.В. Раменская

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Минздравсоцразвития РФ

Контактная информация: Сивков Андрей Сергеевич assivkov2010@mail.ru

У 18 здоровых испытуемых исследована фармакокинетика гипополидемического препарата из группы статинов – Аторвастатина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). У 30 больных гиперлипидемией изучена клиническая эффективность Аторвастатина. На фоне лечения отмечен выраженный гипополидемический эффект со значимым снижением атерогенных показателей липидного спектра крови. Отмечен также незначительный дезагрегантный эффект этого препарата.

Ключевые слова: фармакокинетика, гиперлипидемия.

Известно, что гипополидемическая терапия существенно снижает такие осложнения атеросклероза как коронарная смерть, инфаркт миокарда и стенокардия, острое нарушение мозгового кровообращения, а также внезапную смерть [1-2, 8]. Это стало возможным благодаря применению нового класса гипополидемических препаратов – статинов, которые подавляют активность 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А (ГМГ-КоА) редуктазы, регулирующей скорость синтеза ХС. Вследствие этого снижается пул ХС в клетках печени, увеличивается экспрессия рецепторов к липопротеидам низкой плотности (ЛНП) на поверхности гепатоцитов, стимулируется захват ими частиц ЛНП и липопротеидов очень низкой плотности (ЛОНП) из плазмы крови [1-3, 8, 11, 12].

Все статины быстро всасываются после приема внутрь (30-98%), причем максимальная концентрация в крови достигается в пределах 0,5-4 ч [4-6]. Гипохолестеринемический эффект появляется уже через 3 дня от начала лечения, когда устанавливается стабильная концентрация препарата в крови. Максимальный эффект достигается через 4-6 недель. Общий холестерин (ХС) плазмы крови возвращается к исходному уровню через 1 мес. после отмены максимальных доз препарата. Терапевтический эффект довольно стабилен, явлений тахифилаксии при длительном лечении не наблюдается. Не отмечено существенного влияния ощелачивающих препаратов и блокаторов H_2 -рецепторов, назначаемых при повышенной кислотности желудочного сока, на фармакокинетику Аторвастатина [7, 9, 10].

Целью настоящего исследования являлось проведение сравнительной фармакокинетики Аторвастатина на здоровых добровольцах и изучение клинической эффективности этого препарата у больных с гиперлипидемией.

Материалы и методы

Для проведения фармакокинетики в исследование было включено 18 здоровых испытуемых в возрасте от 18 до 45 лет, которые в начале исследования принимали таблетки Липримар 20 мг («Пфайзер», Германия).

Прием препаратов осуществлялся per os в 8 часов утра в дозе 80 мг одного из препаратов (4 таблетки по 20 мг) Липримара. Отбор крови осуществлялся из кубитальной вены в количестве 5 мл в стеклянные гепаринизированные пробирки до и спустя 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 12 и 24 ч после приема изучаемого препарата. Концентрацию Липримара в плазме крови добровольцев определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Изучение фармакодинамики и клинической эффективности проводилось у 30 больных (от 51 до 75 лет) с острым коронарным синдромом (ОКС), нестабильной стенокардией I-III класса по Braunwald и ГЛП IIА и IIБ типов, не получавших предшествующего лечения антигиперлипидемическими препаратами и клопидогрелем. Из них у 25 больных имела место артериальная гипертония I-II степени, им проводилась традиционная гипотензивная терапия: ингибиторы АПФ (эналаприл, периндоприл), бета-адреноблокаторы (конкор, эгилок, атенолол), антагонисты кальция (кордафлекс, амлолаз), мочегонные (индапамид). У всех больных имела место нестабильная стенокардия. У них не было нарушения рит-

ма и проводимости, требующей постоянной антиаритмической терапии, а также проявлений сердечной недостаточности III-IV ФК по NYHA. Часть больных постоянно принимали пролонгированные нитраты. Липидный спектр сыворотки крови определяли спектрофотометрическим методом, индуцированную агрегацию тромбоцитов – с использованием агрегометра Viola.

Полученные результаты рассчитывали с помощью программы Kinetica™2000 модельно-независимым методом. Полученные экспериментальные данные были подвержены статистической обработке с помощью пакета Systatw5 для ПК. Рассчитывались следующие статистические параметры: среднее арифметическое значение (Mean), среднее геометрическое значение (GMean), стандартное отклонение среднего результата (SD), стандартная ошибка (SE), коэффициент вариации (CV), медиана (Median). Достоверность различий оценивали при доверительной вероятности 95%.

Результаты и их обсуждение

Динамика концентрации Аторвастатина в плазме крови и фармакокинетические параметры Аторвастатина после приема препарата, применяемого добровольцами, представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Как видно из представленных данных, после приема Аторвастатина концентрация препарата достигла максимума через 1,5 ч (26,71±7,1 нг/мл). Фармакокинетические параметры после приема добровольцами таблеток Аторвастатина были: C_{max} – 28,4±0,3нг/мл; T – 1,3±0,3 ч; AUC 0-t – 216,0±78,6 нг*ч/мл; C_{max}/AUC 0-T – 0,130±0,028.

Клиническая эффективность Аторвастатина изучалась у 30 человек в возрасте от 50 до 75 лет. ГЛП IIА типа на-

Таблица 1

Динамика концентрации и фармакокинетические параметры Аторвастатина в плазме крови после приема препарата

Максимальная концентрация, нг/мл							
	Время определения макс. концентрации после приема препарата, ч						
	1	1,5	2	4	6	8	12
Mean	26,3	26,7	24,8	19,5	16,2	13,3	6,6
GMean	25,1	25,8	23,9	18,7	15,7	12,9	–
SD	8,2	7,1	7,0	5,5	4,0	3,3	5,2
CV	31	27	28	28	25	25	78
Median	25,6	26,05	23,95	18,6	16	12,7	8,5
Фармакокинетические параметры							
	C_{max} , нг/мл	T_{max} , ч	AUC_{0-t} , нг*ч/мл	C_{max}/AUC_{0-t}			
Mean	28,4	1,3	228,8	0,130			
GMean	27,5	1,3	216,0	0,127			
SD	7,5	0,3	78,6	0,028			
Median	27,4	1,5	220,1	0,119			
L-95%	24,6	1,2	189,7	0,116			
Up-95%	84,5	1,5	267,9	0,144			

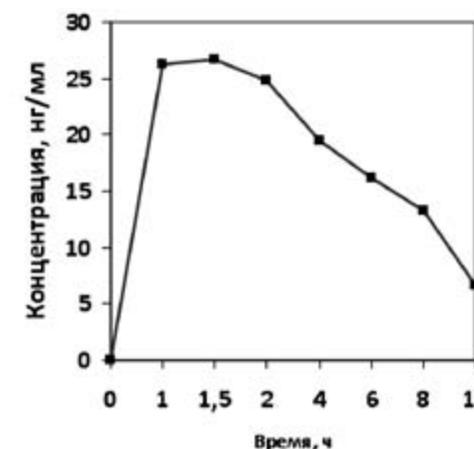


Рис. 1. Концентрация препарата Аторвастатин в плазме крови здоровых добровольцев.

блюдалась у 14-ти, ИБ типа – у 16-ти человек. У всех пациентов имела место ИБС, нестабильная стенокардия, артериальная гипертензия I и II степени была у 25 больных.

Контроль липидного спектра, биохимическое исследование крови, агрегация тромбоцитов и MEGX-тест у исследуемых больных проводились до начала лечения и через 1, 2, 3, 4 мес. терапии.

Аторвастатин назначался в первоначальной дозе 10 мг с последующей коррекцией дозы на каждом контрольном этапе обследования. Суточная доза препарата при необходимости увеличивалась и колебалась у разных больных от 10 до 80 мг.

Динамика показателей липидного спектра крови у исследуемых больных представлена в табл. 2.

Таблица 2

Динамика показателей липидного спектра крови у больных с гиперлипидемией на фоне терапии Аторвастатином (n=30)

Показатель	До начала лечения	На фоне проводимой терапии			
		через 1 мес.	через 2 мес.	через 3 мес.	через 6 мес.
Общ. Хс, ммоль/л	7,12±0,12	**** 5,88 ±0,14	**** 5,34±0,13	**** 5,07±0,15	**** 4,83±0,14
		-17,4%	-25,0%	-28,8%	-32,1%
ТГ, ммоль/л	2,13±0,11	** 1,70±0,12	*** 1,60±0,13	*** 1,58±0,14	*** 1,54±0,15
		-20,2%	-24,9%	-25,8%	-27,7%
Хс ЛПВП, ммоль/л	1,19±0,13	1,17±0,11	1,16±0,12	1,14±0,14	1,13±0,16
Хс ЛПНП, ммоль/л	4,96±0,15	**** 3,94±0,13	**** 3,45±0,14	**** 3,21±0,15	**** 3,00±0,16
		-20,5%	-30,4%	-35,3%	-39,5%
Хс ЛПОНП, ммоль/л	0,97±0,07	** 0,77±0,06	**** 0,73±0,08	** 0,72±0,07	** 0,70±0,08
		-20,6%	-24,7%	-25,8%	-27,8%
Коэффициент атерогенности (КА)	4,98±0,10	**** 4,02±0,11	**** 3,60±0,12	**** 3,45±0,14	**** 3,27±0,13
		-19,3%	-27,7%	-30,7%	-34,3%

Примечание: степени достоверности различий между средними величинами показателей по отношению к исходным (до начала лечения) величинам: **** – p<0,001; *** – p<0,01; ** – p<0,02.

Как видно из представленных данных, до начала лечения отмечались заметно выраженные дислипидемические нарушения в обследованной группе больных. Так, например, общий холестерин

(Общ. Хс), в среднем, составил 7,12±0,12 ммоль/л, концентрация холестерина липопротеидов низкой плотности (Хс ЛПНП) составила, в среднем, 4,96±0,12 ммоль/л. Поскольку в группе присут-

ствовали пациенты со ИБ типом ГЛП, средняя величина триглицеридов (ТГ) была повышена и составила 2,13±0,11 ммоль/л. Отмечалось также повышение холестерина липопротеидов очень низкой плотности (Хс ЛПОНП) и коэффициента атерогенности (КА), которые составили 0,97±0,07 ммоль/л и 4,98±0,10, соответственно. Отмечено также снижение антиатерогенных Хс ЛПВП, в среднем составивших 1,19±0,13 ммоль/л. На фоне терапии Аторвастатином уже через 1 и 2 мес. отмечалась заметная динамика, характеризующаяся изменением ряда

показателей: уменьшением Общ. Хс, ТГ, Хс ЛПНП, КА. Через 3 и 6 мес. динамика вышеуказанных показателей, нося статистически достоверный характер, стала гораздо более выраженной, кроме того, отмечено статистически достоверное снижение Хс ЛПОНП. Что касается антиатерогенных Хс ЛПВП, то колебания их концентрации были весьма незначительными и не носили статистически достоверного характера. Динамика значений индуцируемой агрегации тромбоцитов на фоне терапии Аторвастатином представлена в табл. 3.

Таблица 3

Динамика значений индуцируемой агрегации тромбоцитов на фоне терапии Аторвастатином, % на 4 млн (n=30)

До начала лечения	На фоне проводимой терапии			
	через 1 мес.	через 2 мес.	через 3 мес.	через 4 мес.
16,51±0,12				
	16,23± 0,13	16,13±0,15	* 15,9±0,14	* 16,04±0,14
			-3,2%	-2,9%

Примечание: * – степени достоверности различий между средними величинами показателей по отношению к исходным (до начала лечения) величинам (p<0,02).

При исследовании изначально повышенной ИАТ на фоне изолированной терапии Аторвастатином существенной динамики не наблюдалось в течение первых двух мес., и лишь на 3-й и 4-й мес. отмечено нерезкое снижение агрегации тромбоцитов, которое было статистически достоверно.

Выводы

Таким образом, при оценке фармакокинетических параметров исследуемых препаратов установлено, что для Аторвастатина C_{max} составляет 28,4±0,3

нг/мл, через T_{max} 1,3±0,3 ч, при этом AUC_{0-t} составила 216,0±78,6 нг*ч/мл. Отмечена высокая эффективность Аторвастатина как антигиперлипидемического препарата, заключающаяся в снижении атерогенных показателей липидного спектра у больных с гиперлипидемией ПА и ИБ типов. Аторвастатин обладает слабым дезагрегантным эффектом, характерным для статинов, который проявляет себя на 3-й мес. от начала терапии и практически не изменяется в течение всего курса лечения.

Список литературы

1. **Кукес В.Г.** Клиническая фармакология. М:ГЭОТАРМЕД. 2008.
2. **Кукес В.Г.** Метаболизм лекарственных средств; клинико-фармакологические аспекты. М.: Рефарм. 2004.
3. **Ayanian J.Z., Fuchs C.S., Stone R.M.** Lovastatin and rhabdomyolysis. *Ann. Intern. Med.* 1988. 109: 682-683.
4. **Corsini A., Bellosto S., Baetta R. et al.** New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol. Ther.* 1999. 84: 413-428.
5. **Desager L.P., Horsmans Y.** Clinical pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* 1996. 31: 348-341.
6. **Kivisto K.T., Kantola T., Neuvonen P.J.** Different effects of itraconazole on the pharmacokinetics of fluvastatin and lovastatin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998. 46: 49-53.
7. **Lennernas H., Fager G.** Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* 1997. 32: 403-425.
8. **Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Study Group.** Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N. ENGL. J. MED.* 1998. 339: 1349-1357.
9. **Muck W.** Rational assessment of the interaction profile of atorvastatin supports its low propensity for drug interactions. *Drugs.* 1998. 56 (Suppl. 1): 15-23.
10. **Richter W.O., Jacob B.G., Schwandt P.** Interaction between fibre and lovastatin. *Lancet.* 1991. 338: 706.
11. **Shepherd J., Cobble S.M., Ford J. et al.** Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 1995. 333: 1301-1307.
12. **Stern R.H., Gibson D.M., Whitfield L.R.** Cimetidine does not alter atorvastatin pharmacokinetics or LDL-cholesterol reduction. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1998. 53: 475-478.

Pharmacokinetics and clinical efficacy of the lipid-lowering drug Atorvastatin

A.S. Sivkov, S.K. Sivkova, V.G. Kukes, G.V. Ramenskaya

The pharmacokinetics of lipid-lowering drug of the statin – Atorvastatin by HPLC in 18 healthy humans are examined. In 30 patients with hyperlipidemia studied the clinical efficacy of Atorvastatin. The treatment marked by a pronounced hypolipidemic effect with a significant decrease in atherogenic lipids profile. A slight antiplatelet effect of this drug also noted.

Key words: pharmacokinetics, hyperlipidemia.

Оценка токсичности *in vitro* нового перевязочного материала

А.А. Чурин, М.Г. Данилец, А.М. Дыгай

НИИ фармакологии Сибирского отделения РАМН, Томск

Контактная информация: М.Г. Данилец 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

В сообщении представлены результаты изучения прямой и непрямой цитотоксичности нового перевязочного материала (ПМ) в сравнении со стандартной марлевой повязкой. Было обнаружено, что при прямом контакте нетканого полимерного микроволокнистого ПМ с клетками в течение 24 ч культивирования не происходило изменений морфологии клеток и не увеличивалось количество погибших клеток как при визуальной оценке, так и в МТТ-тесте. Экстракт, полученный из ПМ, также не проявлял цитотоксического действия в отношении тестируемых клеток. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что ПМ соответствует международному стандарту ISO 10993-5, применяемому к медицинским изделиям, и может в дальнейшем применяться в клинической практике для лечения инфицированных ран.

Ключевые слова: цитотоксичность, перевязочные материалы, разработка биосовместимых биоматериалов.

В ранее проведенном экспериментальном исследовании были выявлены ранозаживляющие и антибактериальные свойства нового перевязочного материала, в котором неорганические волокна оксидно-гидроксидных фаз алюминия нанесены на полимерные ацетилцеллюлозные волокна. Нетканые материалы с диаметром волокон 1–3 мкм обладают более развитой поверхностью и высокопористой структурой, чем материалы из более толстых волокон, что обеспечивает способность быстро впитывать и хорошо удерживать питательную жидкость. Впитывающая способность материала усилена за счет введения в основу пористых частиц гидрата окиси алюминия, полученных из порошка алюминия электрозрывным способом. Было показано, что этот материал уменьшает период заживления и значительно ускоряет са-

нацию инфицированной раны, оказывая положительное влияние на процессы регенерации тканей [2].

В связи с этим, **целью** настоящего исследования являлось изучение соответствия перевязочного материала международным стандартам, применяемым к медицинским изделиям, и, в частности, изучение цитотоксичности нового перевязочного материала *in vitro* согласно стандарту ISO 10993-5 [1, 3].

Материалы и методы

Характеристика образца. Перевязочный материал (ПМ) выполнен на основе нетканой микроволокнистой ткани из биологически инертного полимера – ацетата целлюлозы методом электроформования в Институте физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск. На микроволокнах закреплены высоко-

дисперсные частицы гидрата окиси алюминия, полученные из электровзрывных порошков алюминия, размером 0,2-5,0 мкм с удельной поверхностью 100-250 м²/г и пористостью 50-95%.

Клеточные культуры. Использовали четыре линии опухолевых клеток – мастоцитомы мыши Р-815, аденокарцинома мыши Эрлиха, фибросаркома мыши L-929 и эритромиелололейкоз человека К-562. Все клеточные линии хранились в условиях глубокой заморозки в жидком азоте. Для исследования были взяты клетки, прошедшие 2-4 пассажа. Клеточные линии культивировались в полной культуральной среде, содержащей RPMI 1640 (Sigma), 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone), 2 mM L-глутамин (Sigma), 10 mM HEPES (Serva), 0,05 mM 2-меркаптоэтанола (Fluka) и 50 мг/мл гентамицина (Sigma).

Непрямая цитотоксичность. Вытяжки из нового перевязочного материала получали путем проведения экстракции исследуемого образца площадью 12 см² в 4 мл полной культуральной среды (ПКС) в течение 72 ч при 37°C. В качестве отрицательного контроля использовали вытяжку из медицинского бинта (ГОСТ 1172-93), которую получали путем проведения экстракции исследуемого образца площадью 24 см² в 4 мл ПКС в течение 72 ч при 37°C. Экстракцию проводили в стерильных, химически инертных контейнерах. Вытяжки использовали сразу после приготовления. В качестве положительного контроля применяли 0,01% раствор фенола, в качестве контроля реактива – ПКС без исследуемого материала.

Опухолевые клетки культивировали в пластиковой посуде (96-луночные планшеты, Costar) в концентрации 2x10⁵ кл/мл культуральной среды в присутствии вы-

тяжек из нового перевязочного материала, отрицательного и положительного контролей в конечном объеме 50%, 25%, 12,5% и 6,25%. На каждый контроль и опыт использовали 4-5 лунок. Инкубировали планшеты 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Далее определяли цитотоксичность ПМ методом качественной и количественной оценки. Качественная оценка: визуальное исследование клеток с помощью светового микроскопа, оценивали общую морфологию, вакуолизацию, расщепление, лизис клеток и целостность мембран. Результаты выражали в процентах. Количественная оценка: подсчитывали число живых и погибших клеток с использованием суправитальной окраски (0,1% трипановый синий) и пролиферацию клеток с помощью МТТ-теста [4]. Для этого по 0,1 мл клеточной суспензии переносили в 96-луночный планшет, добавляли 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (МТТ, «Serva»), концентрация которого в лунках составляла 200 мкг/мл, культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и абсолютной влажности 4 ч, после чего надосады удаляли, осадок растворяли диметилсульфоксидом (DMSO, Sigma) и измеряли абсорбцию растворов при длине волны 550 нм с использованием спектрофотометра («LabSystems»). Результаты выражали в единицах оптической плотности.

Прямая цитотоксичность. Это исследование позволяет осуществить качественную и количественную оценку цитотоксичности. Инкубировали культуру опухолевых клеток при температуре 37°C в воздухе в присутствии 5% CO₂ до тех пор, пока культура не вырастет приблизительно до соприкосновения клеток в конце логарифмической фазы кривой роста. Проводили визуальный контроль

культуры, используя микроскоп. Удаляли ПКС. Клетки помещали в 24-луночный планшет в концентрации 2x10⁵/мл в свежую ПКС, и в каждую лунку помещали отдельные препараты исследуемого образца и стерильного бинта на клеточный слой в центре каждой лунки с таким расчетом, чтобы препараты покрывали 1/10 поверхности клеточного слоя. В качестве положительного контроля применяли 0,01% раствор фенола, который добавляли к опухолевым клеткам в конечном объеме 50% и 25%, в качестве контроля реактива – ПКС без исследуемого материала. На каждый контроль и опыт использовали 3-5 лунок. Инкубировали планшеты 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Далее определяли цитотоксичность методом качественной и количественной оценки. Качественная оценка: осматривали клетки через световой микроскоп, оценивали общую морфологию, вакуолизацию, расщепление, лизис клеток и целостность мембран. Результаты выражали в процентах. Количественная оценка: подсчитывали число живых и погибших клеток с использованием суправитальной окраски (0,1% трипановый синий) и пролиферацию клеток с помощью МТТ-теста [4].

Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением пакета статистических программ StatPlus 2009 (AnalystSoft Inc.) с предварительной оценкой нормальности распределения и использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Непрямая цитотоксичность. Исследование влияния вытяжек из изучаемого перевязочного материала показало, что добавление их в различных концентрациях в культуру опухолевых клеток достоверно не повышало процент клеток,

имеющих отклонения в морфологии, по сравнению с контролем реактива. Относительно группы отрицательного контроля (вытяжки из стерильного бинта) также не было выявлено статистически значимого негативного влияния вытяжек из исследуемого перевязочного материала на морфологию и жизнеспособность опухолевых клеток. Добавление в культуру опухолевых клеток раствора фенола (положительный контроль) значительно увеличивало процент клеток, имеющих отклонения в морфологии, как по сравнению с контролем реактива, так и с опытной группой, и также значительно увеличивало процент гибели клеток как по сравнению с контролем реактива, так и с опытной группой.

Добавление вытяжек из исследуемого ПМ в различных концентрациях в культуру опухолевых клеток, в основном, не угнетало пролиферативную активность клеток различных линий по сравнению с контролем реактива (табл. 1). Лишь при внесении значительного объема вытяжек из ПМ (25% и 50%) в культуру клеток Эрлиха наблюдалось достоверное снижение пролиферативного потенциала опухолевых клеток, также как и в случае с добавлением вытяжек из стерильного бинта. При добавлении вытяжек из исследуемого перевязочного материала в культуру клеток мастоцитомы Р-815 отмечалось даже стимулирование пролиферации опухолевых клеток. Относительно группы отрицательного контроля также, в основном, не было выявлено статистически значимого негативного влияния вытяжек из исследуемого перевязочного материала на пролиферацию опухолевых клеток. Лишь при внесении вытяжек из ПМ в объеме 12,5% и 50% в культуру клеток К-562 наблюдалось достоверное

снижение пролиферативного потенциала опухолевых клеток по сравнению с группой отрицательного контроля, однако относительно контроля реактива статистически значимых изменений не отмечалось. Добавление в культуру

опухолевых клеток раствора фенола (положительный контроль) значительно угнетало дозозависимым образом пролиферацию опухолевых клеток как по сравнению с контролем реактива, так и с опытной группой.

Таблица 1

Влияние вытяжек из исследуемого перевязочного материала на пролиферацию клеток опухолевых линий (единицы оптической плотности) (M±m)

Экспериментальные группы	Концентрация вытяжек (в %)	Опухолевые линии			
		P-815	K-562	Опухоль Эрлиха	L-929
Контроль реактива	–	891,0±25,2	455,0±16,5	831,7±28,1	712,5±20,6
Отрицательный контроль (стерильный бинт)	6,25	992,3±16,5*	544,8±27,4*	747,5±38,7	655,5±22,9
	12,5	858,3±18,7	450,0±8,5	758,2±22,6	666,5±17,5
	25	840,8±10,3	492,2±19,3	676,7±15,3*	577,2±18,5*
	50	782,8±32,5*	558,0±30,1*	632,0±26,1*	544,5±49,3*
Опыт (исследуемый перевязочный материал)	6,25	985,7±16,7*\$	489,7±19,8\$	752,7±30,9\$	683,5±22,9
	12,5	988,2±22,3*\$#	412,5±6,0\$#	904,25±59,5\$	666,5±20,2
	25	1008,5±33,4*\$#	454,0±22,9\$	709,2±22,2*\$	761,5±43,7#
	50	980,7±59,5\$#	432,6±14,3\$#	612,0±5,6*\$	688,0±31,1#
Положительный контроль (фенол)	6,25	432,5±20,3*	247,5±17,5*	553,5±36,7*	–
	12,5	222,7±21,9*	175,0±10,3*	349,2±26,2*	–
	25	141,6±8,9*	162,8±9,4*	203,7±19,7*	–
	50	83,2±3,0*	97,4±3,4*	108,5±11,3*	–

Примечание: * – различия с контролем реактива достоверны, p<0,05; # – различия между опытной группой и отрицательным контролем достоверны, p<0,05; \$ – различия между опытной группой и положительным контролем достоверны, p<0,05.

Прямая цитотоксичность. Исследование влияния прямого контакта нового ПМ показало, что добавление его в культуру опухолевых клеток достоверно не повышало процент клеток, имеющих отклонения в морфологии и уровне жизне-

способности, по сравнению с контролем реактива. Относительно группы отрицательного контроля (стерильный бинт) также не было выявлено статистически значимого негативного влияния исследуемого перевязочного материала на

морфологию и жизнеспособность опухолевых клеток. Добавление в культуру опухолевых клеток раствора фенола (положительный контроль) значительно снижало уровень жизнеспособности и увеличивало процент клеток, имеющих отклонения в морфологии, как по сравнению с контролем реактива, так и с опытной группой.

Добавление исследуемого ПМ в культуру опухолевых клеток не угнетало пролиферативную активность клеток различных линий по сравнению с кон-

тролем реактива (табл. 2). Относительно группы отрицательного контроля (стерильный бинт) также не было выявлено статистически значимого негативного влияния вытяжек из исследуемого ПМ на пролиферацию опухолевых клеток. Добавление в культуру опухолевых клеток раствора фенола (положительный контроль) значительно угнетало дозозависимым образом пролиферацию опухолевых клеток как по сравнению с контролем реактива, так и с опытной группой.

Таблица 2

Влияние исследуемого перевязочного материала на пролиферацию клеток опухолевых линий (единицы оптической плотности) (M±m)

	Опухолевые линии			
	P-815	K-562	Опухоль Эрлиха	
Контроль реактива	550,0±13,2	395,2±16,6	657,7±11,3	
Отрицательный контроль (стерильный бинт)	493,3±20,8	392,6±6,1	670,7±15,4	
Опыт (исследуемый перевязочный материал)	517,0±30,5\$	401,0±8,6\$	654,3±26,7\$	
Положительный контроль	фенол 25% от объема	141,6±8,9*	108,0±3,7*	134,7±9,3*
	фенол 50% от объема	83,2±3,0*	89,6±2,7*	101,0±5,0*

Примечание: * – различия с контролем реактива достоверны, p<0,05; # – различия между опытной группой и отрицательным контролем достоверны, p<0,05; \$ – различия между опытной группой и положительным контролем достоверны, p<0,05.

На основе полученных результатов показано, что прямой контакт ПМ и бинта медицинского с клетками в течение 24 ч культивирования не приводил к изменению их морфологии и жизнеспособности.

Экстракт, полученный из ПМ, также не проявлял цитотоксического действия в отношении тестируемых клеток. Однако экстракт из бинта медицинского в больших концентрациях мог оказывать повреждающее действие на тестовые

клетки, хотя и мало влиял на морфологию клеток. Это может быть связано с технологическими особенностями обработки бинта, при котором используются некоторые химические агенты. Остаточные количества этих агентов могли привести к наблюдавшемуся негативному влиянию. Такого недостатка лишен исследованный перевязочный материал.

Полученные результаты позволяют заключить, что исследованный ПМ со-

ответствует международному стандарту ISO 10993-5, применяемому к медицинским изделиям, и может в дальнейшем применяться в клинической практике для лечения ран.

Список литературы

1. ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*. – М.: Стандартиформ. 2010. 17 с.

2. Патент (RU) № 2397781 от 27.08.2010 г. «Нетканый материал медицинского назначения, обладающий

ранозаживляющей, антибактериальной и противовирусной активностью и перевязочное средство на его основе» / Дыгай А.М., Лернер М.И., Новицкий В.В., Огородова Л.М., Псахье С.Г., Чуринов А.А.

3. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for cytotoxicity, *in vitro* methods. International Standardization Organisation, Geneva. 1992.

4. Mosmann T.R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. 1983. N 5. P. 55-63.

Assessment of toxicity *in vitro* of a new bandaging material

A.A. Churin, G.M. Danilets, A.M. Dygai

Article presents results of the study of new bandaging material's direct contact and indirect cytotoxicity assays in comparison with cotton gauze. It has been found that in direct contact of nonwoven polymeric fibrous bandaging material (BM) with cells for 24 hours of cultivation no changes in cell morphology take place, nor does the amount of dead cells increase. These conclusions have been made by means of both a visual examination and an MTT assay. The BM extract did not have any cytotoxic effect on the tested cells either. The obtained results allow us to make a conclusion that the BM complies with the international standard ISO 10993-5, which is applied to medical goods, and can be applied in the treatment of infected wounds in clinical practice.

Key words: cytotoxicity, bandaging materials, development of biocompatible biomaterials.

Применение биологической модели для оценки кишечной проницаемости *in vitro* – монослоя эпителиальных клеток Caco-2

И.Е. Шохин^{1,2}, Ю.И. Кулинич^{1,2}, Г.В. Раменская^{1,2,3}, В.Г. Кукес^{1,2,3}

¹ – ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Минздравсоцразвития РФ, Москва

² – ФГБУ «НЦ ЭСМП», Минздравсоцразвития РФ, Москва

³ – Филиал «Клиническая Фармакология» НЦБМТ РАМН, Москва

Контактная информация: Кукес Владимир Григорьевич elmed@yandex.ru

Статья посвящена применению монокультуры клеток аденокарциномы толстого кишечника – Caco-2 для оценки проницаемости лекарственных веществ (ЛВ) *in vitro*. Описаны основные преимущества использования данной биологической модели. Приведены общие принципы, подходы и методология определения проницаемости на культуре клеток Caco-2. Показана корреляция между значениями кишечной проницаемостью, определенной в условиях *in vivo* и кажущимися коэффициентами кишечной проницаемости *in vitro*.

Ключевые слова: клетки Caco-2, проницаемость, абсорбция.

Введение

Одной из ключевых задач современной фармации и биомедицины является понимание процесса доставки лекарственного вещества (ЛВ) до органа или клеток-мишеней. Для этого необходимо объективно оценить поведение лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Для того чтобы действующее вещество достигло системного кровотока, оно должно пройти через следующие стадии: высвобождение из лекарственной формы, растворение в физиологических средах ЖКТ, абсорбция через кишечную (или желудочную) мембрану [1]. Степень проницаемости ЛВ через стенку кишечника можно достоверно определить в исследованиях *in vivo*: например, определением абсолютной биодоступности, анализом массового баланса, исследованиями методом кишечной перфузии [2]. Подобные дан-

ные являются наиболее достоверными, однако такие исследования достаточно трудоемкие и дорогостоящие, а также вовлекают в испытание здоровых добровольцев, что вызывает дополнительные этические сложности. Поэтому на протяжении последних 15 лет для исследователей в области биомедицины и биофармации стояла задача разработать метод, позволяющий косвенно, но с достаточной степенью достоверности, надежности и воспроизводимости оценить кишечную проницаемость [3-5].

Методы оценки кишечной проницаемости

Среди методов, позволяющих косвенно оценить степень абсорбции субстанций, можно выделить 3 основные группы: исследования *in situ* (например, на тонком кишечнике крыс) [4], исследования на моделях *in vitro* (например, на монокультурах различных линий клеток) [5],

а также исследования на моделях *in silico* (например, путем расчета коэффициентов распределения $\log P$ или $C \log P$) [3]. Также была выявлена корреляция между интенсивностью метаболизма и проницаемостью ЛВ, однако она все еще находится в стадии обсуждения [6]. Данные, полученные *in situ*, обладают высокой достоверностью (для всех 20 изученных модельных субстанций данные *in situ*, полученные на кишечнике крыс, и данные *in vivo* качественно совпали), однако эти испытания являются достаточно дорогостоящими, что не позволяет использовать их для рутинных или скрининговых исследований [4]. Математическая оценка проницаемости является наиболее простым способом, но ее надежность недостаточно высока, поскольку не учитывает многие реальные физиологические факторы (например, роль белков-транспортеров). Например, только для 19 модельных ЛВ из 29 качественно совпали данные по проницаемости *in vivo*, определенной методом кишечной перфузии, и косвенно на основании показателей $\log P$ и $C \log P$ (то есть достоверность составила около 70%) [3].

Начиная с 90-х гг., когда впервые была установлена возможность оценить проницаемость, используя клеточные модели *in vitro*, данное направление стало активно развиваться. При анализе активности публикаций в данном направлении было выявлено, что их общее количество в ведущих рецензируемых журналах выросло до 120-140 в год [7]. Среди клеточных моделей (Caco-2, MDCK, HT29-MTX, TC-7) наиболее широко применяемой для данной цели стала культура клеток аденокарциномы толстого кишечника – Caco-2 [8].

Общие характеристики культуры клеток Caco-2

Данная культура клеток была получена из аденокарциномы толстого кишечника человека. При культивировании клетки Caco-2 начинают дифференцироваться в поляризованные клетки кишечного эпителия с покрытой микроворсинками апикальной частью мембраной на базолатеральной части и плотными межклеточными контактами [8]. Несмотря на то, что клетки Caco-2 имеют происхождение из толстого кишечника, они проявляют большинство морфологических и функциональных характеристик энтероцитов тонкого кишечника, в том числе выработку ферментов I и II фазы, а также мембранных транспортеров, включая гликопротеин P и белок MRP. В то же время данная культура клеток имеет и ряд отличий от клеток эпителия тонкого кишечника. Клетки Caco-2 обладают более высоким значением трансэпителиального электрического сопротивления по сравнению с энтероцитами (обычно от 3 до 30 раз), они неспособны вырабатывать слизь (которая в тонком кишечнике вырабатывается бокаловидными клетками), у них различается содержание ионов кальция в межклеточном пространстве. Кроме того, уровень экспрессии гликопротеина P у клеток Caco-2 превышает таковой в толстом кишечнике приблизительно на порядок. Все вышеуказанные факторы не могут не вносить свой вклад в проницаемость ЛВ через монослой клеток Caco-2 [7-9].

Моделирование транспорта ЛВ через монослой клеток Caco-2

Транспорт ЛВ через мембрану тонкого кишечника может протекать одним или несколькими из четырех механизмов: пассивная диффузия, пассивный параклеточный транспорт (через плотные контакты), активный транспорт с участием переносчиков и трансцитоз.

Исследования проницаемости на культуре клеток Caco-2 проводились для ЛВ со всеми механизмами транспорта [9].

Lennepras с соавт. провели исследование проницаемости ряда ЛВ, всасывающихся пассивной диффузией и параклеточным транспортом на монослой клеток Caco-2, и сравнили полученные данные с известными коэффициентами кишечной проницаемости, полученными методом кишечной перфузии. Было установлено, что для ЛВ, механизмом транспорта которых является простая диффузия, значение коэффициента кишечной проницаемости ($P_{\text{eff in vivo}}$) и кажущегося коэффициента проницаемости (apparent permeability, $P_{\text{app in vitro}}$) на клетках Caco-2 различаются не более чем в 2-4 раза, в то время как для субстанций с параклеточным транспортом проницаемость через монослой клеток была в 20-80 раз ниже. Данное явление имеет два основных объяснения: разным количеством пор в плотных контактах и разной площадью абсорбирующей поверхности у клеток Caco-2 и энтероцитов. Кроме того, такие отличия могут быть связаны с отсутствием центральной иннервации клеток Caco-2 и отсутствием в них системного кровотока [10].

В то же время было показано, что подобные различия носят только количественный, но не качественный характер. В исследовании проницаемости полиэтиленгликолей (гидрофильное вещество с параклеточным транспортом) было показано, что она возрастает с молекулярной массой также как и кишечная проницаемость *in vivo*, несмотря на различия коэффициентов $P_{\text{eff in vivo}}$ и $P_{\text{app in vitro}}$ более чем в 100 раз. Таким образом, моделирование параклеточного транспорта ЛВ на культуре клеток Caco-2 может быть оценено качественно [7, 9].

Субстанции, абсорбирующиеся через стенку кишечника активным транспортом, также имеют более низкие значения кажущейся кишечной проницаемости, что связано с более низкой степенью экспрессии у клеток Caco-2 ряда транспортеров, в том числе ионных и пептидных транспортеров. В то же время гликопротеин P вырабатывается у них в меньшей степени, чем у энтероцитов, что приводит к занижению результатов [9].

Корреляция результатов определения проницаемости *in vivo* и *in vitro*

Несмотря на значительные различия (до двух порядков) степени проницаемости *in vivo* и *in vitro*, исследователями неоднократно делались попытки выявить корреляцию между абсорбцией в тонком кишечнике и на культуре клеток Caco-2. Такая корреляция была впервые установлена Artursson с соавт. на 20 модельных субстанциях, кроме того, ими были рекомендованы качественные критерии проницаемости на монослой клеток Caco-2: для ЛВ, которые полностью абсорбируются в ЖКТ, $P_{\text{app in vitro}}$ принимает значения свыше 1×10^{-6} см/с; для ЛВ, степень абсорбции которых лежит в интервале от 1% до 100% $P_{\text{app in vitro}}$ принимает значения от 1×10^{-7} см/с до 1×10^{-6} см/с; для ЛВ, абсорбирующихся менее чем на 1%, $P_{\text{app in vitro}}$ принимает значения ниже 1×10^{-7} см/с [11]. Было проведено большое количество исследований проницаемости на культуре клеток Caco-2, при этом данные по хорошей корреляции с кишечной абсорбцией были установлены неоднократно. В то же время данные, полученные в разных лабораториях, имели значительные (в несколько раз) количественные различия при их близком качественном сходстве [9]. Например, рекомендуемые разными исследователями критерии «высокой» (т.е. более 90%) проницаемости,

установленной на клеточном монослое, находятся в интервале от 1×10^{-6} см/с до 1×10^{-5} см/с [12]. Низкая лабораторная воспроизводимость в первую очередь связана с гетерогенностью культуры клеток Сасо-2. Кроме того, свойства монослоя зависят от времени культивирования, числа пассажей, питательной среды [7-9]. Однако поскольку основной областью применения культуры клеток Сасо-2 служит именно качественная оценка кишечной проницаемости, решением проблемы воспроизводимости является использование внутренних стандартов. В качестве внутренних стандартов рекомендуется использовать модельные маркеры проницаемости из перечня, предложенного FDA [13]. В перечне приведены стандарты «низкой» (менее 90%) и «высокой» (90% и более) кишечной проницаемости, а также стандарт для оценки проницаемости ЛВ, транспортируемых гликопротеином Р, и маркер нулевой проницаемости (табл. 1).

В качественно спланированные исследования проницаемости обычно включают несколько (до 10) внутренних стандартов. Такие исследования могут даже позволить количественно оценить проницаемость ЛВ при обработке данных с помощью моделирующих компьютерных программ, например, GastroPlus™ (Simulation Plus Inc) [14].

Именно большое количество данных по надежной корреляции результатов, полученных в хорошо валидированных исследованиях по изучению проницаемости *in vitro* на значительном количестве ЛВ с различными свойствами и механизмами транспорта, позволили рекомендовать монослой эпителиальных клеток Сасо-2 в качестве «золотого стандарта» для моделирования кишечной абсорбции, оценке биодоступности и биоэквивалентности [14].

Методика определения проницаемости *in vitro* на культуре клеток Сасо-2

Процедура определения проницаемости на культуре клеток Сасо-2 состоит из следующих этапов [8]:

1. Культивирование клеток.
2. Инкубирование клеток на микропористом фильтре.
3. Тест пригодности системы (измерение трансэпителиального электрического сопротивления или тест с маркерами проницаемости).
4. Определение проницаемости ис-

Таблица 1

Модельный перечень субстанций для оценки проницаемости

Субстанция	Проницаемость
антипирин	«высокая» ¹
кофеин	«высокая»
карбамазепин	«высокая»
флувастатин	«высокая»
кетопрофен	«высокая»
метопролол	«высокая» ¹
напроксен	«высокая»
пропранолол	«высокая»
теофиллин	«высокая»
верапамил	«высокая» ²
амоксцилин	«низкая»
атенолол	«низкая»
фуросемид	«низкая»
гидрохлортиазид	«низкая»
маннитол	«низкая» ¹
α-метилдопа	«низкая»
ПЭГ-400	«низкая»
ПЭГ-1000	«низкая»
ПЭГ-4000	«низкая» ³
ранитидин	«низкая»

Примечание: ¹ – рекомендуемые внутренние стандарты; ² – стандарт для оценки проницаемости ЛВ, транспортируемых гликопротеином Р; ³ – маркер нулевой проницаемости.

пытываемой субстанции (с внутренним стандартом).

5. Количественное определение.

Культивирование клеток проводят на питательной среде (например, ДМЕМ), в состав которой входят заменимые аминокислоты (1%), глюкоза (25 мМ), глутамин (2 мМ) с прибавлением сыворотки крови эмбриональной телячьей (15-20%) и антибиотика (например, 100 мкг/мл гентамицина). Клетки культивируют в инкубаторе при 37°C в атмосфере с содержанием 5-10% CO₂ и 90-95% O₂ и относительной влажности 95%, среду заменяют каждые 2-3 дня. Для проведения исследований проницаемости используют клетки после 25-100 пассажей [8, 9, 14].

Клетки Сасо-2 переносят на микропористые фильтры в количестве приблизительно от 25 000 до 40 000 клеток/см² (рис.) и инкубируют в течение около 20 дней при вышеуказанных условиях с заменой питательной среды каждые 2-3 дня [8, 9, 14].

Определение проницаемости на культуре клеток Сасо-2 недопустимо проводить до тех пор, пока не будет установ-

лена целостность и функциональность монослоя. Для определения пригодности системы проводят одно из нижеописанных испытаний: определение трансэпителиального электрического сопротивления или тест с маркерами низкой проницаемости (например, люциферовым желтым, родамином, маннитолом или ПЭГ-400). Монослой клеток Сасо-2 считается пригодным для определения проницаемости, если значение трансэпителиального электрического сопротивления выходит на плато и принимает значения от 260 Ом/см² до 400 Ом/см², либо степень проницаемости маркеров не превышает предельного допустимого значения. Рекомендуется проводить оба испытания, однако одного из них будет достаточно [7, 8, 9].

Проницаемость ЛВ изучают в двух направлениях: от апикальной стороны к базолатеральной, и наоборот. Значение рН в донорном (апикальном) и акцепторном (базолатеральном) отсеке обычно составляет 7,4. После внесения пробы и внутренних стандартов в донорный отсек их отбирают спустя установленные интервалы времени из акцепторного от-

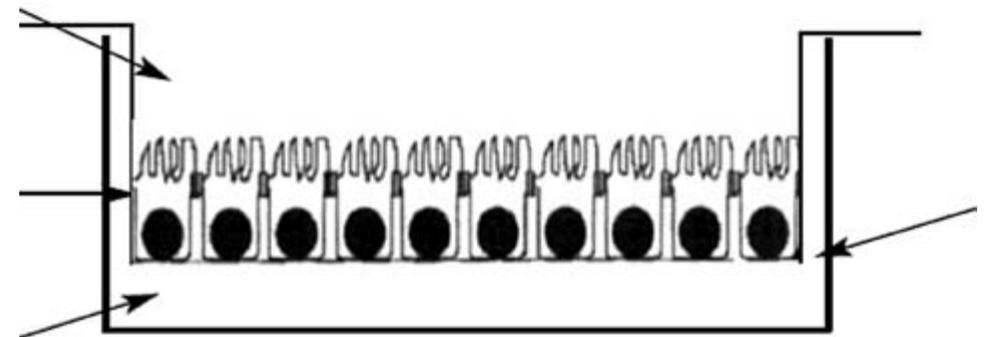


Рис. Схематическое изображение монослоя клеток Сасо-2 на микропористом фильтре.

- 1 – апикальная сторона;
- 2 – клеточный монослой;
- 3 – базолатеральная сторона;
- 4 – микропористый фильтр.

сека и проводят количественное определение методом ВЭЖХ с УФ или МС-детектором. Коэффициент кажущейся кишечной проницаемости рассчитывают по следующей формуле [8]:

$$P_{app\ in\ vitro} = \frac{dC}{dT} \times \frac{V}{A \times C_0}, \text{ где}$$

$P_{app\ in\ vitro}$ – кажущийся коэффициент кишечной проницаемости, см/с;

V – объем пробы, мл;

A – площадь поверхности клеточного монослоя, см²;

C_0 – исходная концентрация исследуемого ЛВ в донорном отсеке, М;

dC/dT – скорость изменения концентрации исследуемого ЛВ в акцепторном отсеке, М/с.

Заключение

Несмотря на некоторые недостатки, которые присущи каждому биологическим моделям, культура клеток Caco-2 была признана надежным и относительно несложным инструментом для прогнозирования кишечной проницаемости ЛВ (табл. 2). Данная модель в настоящее время широко применяется для скрининговых целей при изучении транспорта и абсорбции ЛВ, влияния вспомогательных веществ и лекарственного взаимодействия на процессы всасывания, а также при оценке взаимозаменяемости воспроизведенных ЛВ *in vitro* (процедура «биовейвер») [9, 12]. В связи с вышеуказанным, следует начать развивать данное направление и в России.

Таблица 2

Основные достоинства и недостатки моделирования кишечной проницаемости на культуре клеток Caco-2

Достоинства	Недостатки
Высокий уровень корреляции с данными <i>in vivo</i> , полученный в значительном количестве исследований	Не учитываются некоторые физиологические факторы (слизь, желчные кислоты, площадь поверхности всасывания)
Быстрый и относительно несложный метод	Клетки имеют опухолевое происхождение
Моделирование проводится на клетках человека	Применим преимущественно для качественной оценки проницаемости, поскольку метод обладает невысокой межлабораторной воспроизводимостью

Список литературы

1. **Amidon G.L., Lennerlas H., Shah V.P., Crison J.R.** A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability // *Pharmaceutical Research*. 1995. № 12. P. 413-420.

2. Proposal to waive *in vivo* bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms. Technical Report Series, No 937, 40th Report, Annex 8 of WHO Expert Committee

on Specifications for Pharmaceutical Preparations. World Health Organization (WHO). 2006.

3. **Kasim N.A., Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennernäs H., Hussain A.S., Junginger H.E., Stavchansky S.A., Midha K.K., Shah V.P., Amidon G.L.** Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutic classification // *Molecular Pharmaceutics*. 2004. Vol. 1. № 1. P. 85-96.

4. **Kim J.-S., Mitchell S., Kijek P., Tsume Y., Hilfinger J., Amidon G.L.** The

suitability of an *in situ* perfusion model for permeability determinations: utility for BCS Class I biowaiver requests // *Molecular Pharmaceutics*. 2004. Vol. 1. № 1. P. 85-96.

5. **Yee S.** *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man – Fact or myth // *Pharmaceutical Research*. 1997. Vol. 14. № 6. P. 763-766.

6. **Wu C.-Y., Benet L.** Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport / Absorption / Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System // *Pharmaceutical Research*. 2005. Vol. 22. № 1. P. 11-23.

7. **Artursson P., Palm K., Luthman K.** Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001. Vol. 46. P. 27-43.

8. **Le Ferrec E., Chesne C., Artursson P. et al.** *In Vitro* Models of the Intestinal Barrier. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 46 // *ATLA*. 2001. Vol 29. P. 649-668.

9. **Shah P., Jogani V., Bagchi T., Misra A.** Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption // *Biotechnology Progress*. 2006. Vol. 22. № 1. P. 186-198.

10. **Lennernas H., Palm K., Fagerholm U., Artursson P.** Comparison between

active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells: *In vitro* and human jejunum *in vivo* // *International Journal of Pharmaceutics*. 1996. Vol. 127. № 1. P. 103-107.

11. **Artursson P., Karlsson J.** Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991. Vol 175. №3. P. 880-885.

12. **Dahan A., Miller J.M., Amidon G.L.** Prediction of Solubility and Permeability Class Membership: Provisional BCS Classification of the World's Top Oral Drugs // *AAPS J.* 2009. Vol. 11. № 6. P. 740-746.

13. Guidance for industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S., Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (HHS-FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2000.

14. **Соловьев А.И., Резников А.Г., Тарасенко Л.В., Маргитич В.М.** Первый в Украине успешный опыт применения биовейвера для экспертной оценки лекарственного средства (Летромара) // *Журнал АМН Украины*. 2006. т. 12. № 4. С. 781-794.

Application of biological model for assessment of intestinal permeability of *in vitro* – a monolayer of epithelial Caco-2 cells

I.E. Shohin, J.I. Kulinich, G.V. Ramenskaya, V.G. Kukes

Paper is devoted to the application of epithelial monolayer of human colon adenocarcinoma cells – Caco-2 for *in vitro* permeability evaluation of drugs. Main advantages of this biological model are described. General principles, approaches and methodology of Caco-2 permeability assay are defined. Correlation between human intestinal permeability *in vitro* and apparent permeability coefficient *in vitro* is indicated.

Key words: Caco-2 cells, permeability, absorption.



Полиморфизм генов системы детоксикации ксенобиотиков и его роль в биотрансформации внутривенных анестетиков

О.А. Махарин, Ю.С. Макляков, В.М. Женило

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Контактная информация: д.м.н., проф. Юрий Степанович Макляков Miv1010@yandex.ru

Несмотря на широкий арсенал средств для наркоза, существующий в настоящее время, довольно часто анестезиолог стоит перед проблемой разработки оптимальной схемы анестезиологического пособия. Оценки возрастных, социальных, эмоциональных особенностей пациента зачастую бывает недостаточно, вот почему изучение однонуклеотидных полиморфизмов и их влияния на метаболизм анестетиков, возможно, со временем позволит оптимизировать концепцию «индивидуального подхода» в анестезиологии.

Ключевые слова: фармакогенетика, внутривенная анестезия, биотрансформация, полиморфизмы, аллель, цитохромы.

Хорошо известно, что пациенты по-разному реагируют на введение одного и того же лекарственного вещества [13]. Эффективность действия лекарственных веществ зависит от многих изменяющихся параметров, таких как возраст, пол, функциональное состояние органов и систем, сопутствующей патологии, социальной принадлежности, понимания характера операции, уровня личностной и ситуационной тревожности, генетического полиморфизма. Так, пожилые больные переносят боль лучше молодых; женщины терпеливее мужчин; люди, находящиеся на более высоких ступенях социальной лестницы, переносят боль хуже тех, которые занимают более скромное положение [1].

Изучение фармакогенетических особенностей индивидуума позволяет не только выявлять предрасположенность к различным заболеваниям, но и разрабатывать индивидуальный подход в лечении конкретного пациента [2]. В литературе данный подход получил название концепции «персонализированной медицины». Данная концепция позволяет формировать новые экономически обоснованные диагностические и терапевтические модели на основе генетических маркеров, что в будущем, скорее всего, приведет к изменению инфраструктуры здравоохранения и созданию новых генераций диагностических тестов и лекарственных средств [4]. На сегодняшний день установлено, что вклад генетиче-

ских факторов в вариабельность реакций на введение различных фармакологических препаратов составляет от 20 до 95% [13, 17]. Около 90% генетических вариаций возможно в результате появления так называемых однонуклеотидных полиморфизмов. Однонуклеотидный полиморфизм (англ. Single nucleotide polymorphism — SNP) — это разница в последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом индивида. Частота встречаемости SNP составляет 1 на 100-300 базовых пар генома человека [3]. Исходя из того, что только от 3 до 5% ДНК-последовательностей индивида кодируют продукцию белка, большинство полиморфизмов находятся вне кодируемой области. Однако полиморфизмы, находящиеся внутри кодируемой области генов, способны в значительной степени влиять на изменение третичной и четвертичной структур белка, смену полярности, приводить к ошибкам фосфорилирования и, как следствие, изменять биологические функции белка [9].

Накоплено множество примеров, показывающих, что различия ответа на лекарственную терапию обусловлены вариантами нуклеотидной последовательности генов, кодирующих ферменты метаболизма лекарств, белков-переносчиков, рецепторов, взаимодействующих с лекарствами [10]. Множественный аллелизм или повышенная экспрессия генов могут приводить к повышению скорости элиминации лекарственных средств, что является причиной снижения их эффективности и приводит к необходимости повышения дозы для достижения первоначального эффекта [31]. С другой стороны, наличие дефектных

аллелей может приводить к замедлению метаболизма, в результате чего повышается вероятность развития побочных реакций и изменения межлекарственных взаимодействий.

Скорость метаболизма лекарственных средств оценивается по так называемому метаболическому клиренсу, т.е. по гипотетическому объему плазмы, очищенному от лекарственного вещества вследствие его биотрансформации, или по отношению концентрации субстрата к концентрации его метаболита в плазме крови или моче. В зависимости от активности ферментов, выделяют следующие группы пациентов:

- «Экстенсивные» метаболизаторы – пациенты, у которых клиренс лекарственного средства соответствует среднестатистическим значениям. К ним относятся гомозиготные носители «дикого» аллеля гена соответствующего фермента. Большинство членов популяции относятся к этой группе.
- «Медленные» метаболизаторы – пациенты с низким клиренсом определенных лекарственных средств. Эти пациенты являются гомозиготами (при аутосомно-рецессивном типе наследования) или гетерозиготами (при аутосомно-доминантном типе наследования) носителями «медленного» аллеля гена соответствующего фермента. У пациентов с подобными генетическими дефектами либо вовсе отсутствует синтез фермента метаболизма, либо синтезируется дефектный фермент, в результате чего снижается или полностью исчезает ферментативная активность. У данной категории лиц лекарственный препарат значительно быстрее кумулируется, в связи с чем пациентам данной группы требуются меньшие дозы для достижения необходимого эффекта.

• «Быстрые» метаболизаторы – пациенты, у которых клиренс лекарственного вещества выше по сравнению с экстенсивными метаболизаторами. Они, как правило, гомозиготные (при аутосомно-рецессивном типе наследования) или гетерозиготные (при аутосомно-доминантном типе наследования) носители “быстрого” аллеля гена соответствующего фермента. У данной категории пациентов отмечают невысокие или сниженные показатели отношения концентрации ЛС к концентрации его метаболита. Из всего вышесказанного следует вывод о том, что пациенты данной группы требуют назначения более высоких доз для достижения необходимого терапевтического эффекта [3].

В зависимости от скорости метаболизма лекарственных средств, пациенты с полиморфными генами ферментов-катализаторов ЛС подразделяются на два типа распределения:

- бимодальный тип распределения – в случае выявления двух типов метаболизаторов;
- тримодальный тип распределения – в случае возникновения трех типов [6, 18].

Как известно, метаболизм большинства лекарственных средств, в том числе используемых для проведения тотальной внутривенной анестезии, происходит в печени с участием микросомальных ферментных систем, главной из которых является система цитохромов Р-450. Цитохромы Р-450 – это семейство гемопротеидов, получившее свое название из-за специфической полосы поглощения восстановленного комплекса с оксидом углерода при длине волны 450 нМ. Впервые эти цитохромы были описаны как микросомальные фракции клеток печени

в 1958 г. Клингенбергом [19] и одновременно Гарфинкелом [15] и в последующие несколько лет охарактеризованы Омура и Сато [28]. В настоящее время у человека идентифицировано 58 форм цитохрома Р-450. Изоферменты цитохрома Р-450, по классификации Nebert (1987), по близости аминокислотной последовательности подразделяют на семейства, а последние – на подсемейства. Семейства цитохромов Р-450 принято обозначать римскими цифрами, подсемейства – римскими цифрами и латинской буквой. В метаболизме лекарств основную роль играют цитохромы первых трех семейств [6]. Важной особенностью является высокая стереоселективность СYP по отношению к субстратам. При этом установлено, что в метаболизме лекарственных препаратов может принимать участие как один, так и несколько цитохромов [6].

«Система цитохрома Р-450 чем-то похожа на иммунную систему. Она такая же насыщенная и неспецифическая, как и система антител. Каждый субстрат может метаболизироваться многими энзимами и каждый энзим может метаболизировать многие субстраты» [5]. Средства, применяемые при проведении тотальной внутривенной анестезии, не являются исключением.

Так, в настоящее время установлено, что в метаболизме кетамина ведущую роль принимают СYP2B6, СYP3A4, СYP2C9 [33]. Под действием данных ферментов происходит превращение кетамина в норкетамин. При этом отмечено, что биотрансформация кетамина при применении его в терапевтических концентрациях в основном идет за счет СYP2B6, в то время как участие СYP2C9 и СYP3A4 носят лишь вспомогательный характер [35]. До настоящего

времени нет убедительных данных о клинически значимом влиянии аллельных вариантов на метаболизм кетамина. В то же время параллельное введение кетамина совместно с индукторами или ингибиторами цитохромов значительно изменяли его метаболизм. Общий ингибитор цитохромов (аминобензотриазол) почти полностью блокировал метаболизм кетамина в микросомах млекопитающих. Было также показано, что ингибиторы СYP3A4, СYP2A6, СYP2C19, СYP2B6, СYP2C9 уменьшали скорость N-деметилирования кетамина. Антитела к цитохромам СYP3A4, СYP2A6, СYP2C19, СYP2B6, СYP2C9 также, но в меньшей степени, уменьшают скорость N-деметилирования кетамина [24]. В другом исследовании было проведено изучение влияния ингибитора СYP2B6 тиклопедина и ингибитора СYP3A интраконазола на метаболизм пероральных форм кетамина. Установлено, что тиклопедин значительно угнетает метаболизм кетамина, и в случае необходимости, при совместном применении тиклопедина и кетамина, доза последнего должна быть уменьшена [30]. Также было установлено, что прием рифампицина увеличивает скорость метаболизма кетамина, что, возможно, связано с влиянием рифампицина на СYP3A4 или СYP2B6 [25]. Кроме того, было показано, что кетамин может ингибировать экспрессию СYP3A4 за счет снижения выхода Ca^{2+} и снижения синтеза АТФ, приводя, соответственно, к нарушению ремоделирования цитоскелета [8].

Метаболизм бензодиазепинов. Диазепам метаболизируется до темазепама (продукт гидроксилирования диазепам): $RC_2H_3 \rightarrow RONCH_3$ при участии СYP3A4, и до N-диметилдиазепам (продукт деалкилирования диазепам):

$RNHCH_3 \rightarrow RNH_2 + CH_2O$ при участии СYP2C19 [3]. Помимо этого, фармакокинетика диазепам также зависит от возраста, пола, веса, заболеваний печени. Соотношение темазепама и диметилдиазепам составляет, как правило, 4:1. Исследование фармакокинетики показало, что превращение диметилдиазепам с использованием 2C19 идет путем системы Михаил-Менкеса, в то время как превращение в ферментных системах 3A4 идет нелинейным путем. Установлено, что фармакокинетика диазепам значительно зависит от полиморфизма СYP2C19. Период полувыведения диазепам у быстрых метаболизаторов СYP2C19 (гомозигот по А-аллелю) в 4 раза выше, чем у медленных метаболизаторов. У гетерозиготных по А-аллелю индивидуумов период полувыведения колеблется между этими двумя значениями [16]. У медленных метаболизаторов СYP2C19 отмечалось более частое развитие побочных эффектов при приеме трициклических антидепрессантов, в то время как изменение фармакодинамики диазепам клинически значимо не происходило ни у каких аллельных вариантов. В исследовании японских ученых было показано, что у здоровых волонтеров восстановление ментальных функций после введения 5 мг диазепам происходило одновременно, независимо от аллельных вариантов СYP2C19 [34]. В ряде исследований было показано, что ингибиторы протонной помпы замедляют метаболизм диазепам. Длительный прием омепразола (более 4-х недель) может приводить к изменению фармакодинамики диазепам в виде пролонгации седации либо замедления выхода из наркоза [26].

В отличие от диазепам, клинический ответ на мидазолам слабо ассоциируется

с генетическими факторами. Полиморфизмы CYP3A4 и CYP3A5 связывают со снижением клиренса мидазолама, однако эти ассоциации недостаточно выражены, чтобы говорить о клиническом различии в связи с существованием альтернативных путей метаболизма и экскреции. В то же время определение клиренса мидазолама (скорость его превращения в гидроксимидазол) служит одним из маркеров активности CYP3A4. Например, под действием кетоконазола (ингибитора CYP3A4) происходит замедление превращения мидазолама в 1-гидроксимидазол, в то время как под действием эфавиренза (индуктора CYP3A4) отмечается обратная тенденция. В отличие от других бензодиазепинов, лоразепам метаболизируется путем конъюгации с глюкуроновой кислотой. Печеночная и почечная дисфункции мало влияют на метаболизм лоразепама, в то время как при дисфункции данных органов элиминация мидазолама и диазепама замедлены [27].

До настоящего времени не установлено семейство цитохромов, которое принимает участие в метаболизме **тиопентала**.

Пропофол метаболизируется путем конъюгации с UDF-глюкуроновой кислотой при участии фосфат-глюкуронилтрансферазы и путем окисления при участии CYP2B6 и CYP2C9. Орфенадрин (селективный ингибитор CYP2B6) замедляет метаболизм пропофола в печеночных микросомах. Тем же свойством обладают и специфические антитела к CYP2B6. Антитела к другим цитохромам не влияли на скорость элиминации пропофола. Установлено, что CYP2C9 имеет слабый аффинитет к пропофолу. Было показано, что введение неспецифического ингибитора CYP2B 8-метоксозола в желудочки головного мозга крыс

способствовало пролонгированию длительности сна и приводило к увеличению концентрации пропофола в головном мозге, в то время как плазменный уровень пропофола оставался неизменным [20]. До настоящего времени остается неясным влияние полиморфизма печеночного CYP2B6 на фармакодинамику пропофола и значимое влияние на течение анестезии. SULT1A1 и NQO1 принимают участие в последующих этапах метаболизма пропофола [32]. Установлено, что пропофол угнетает активность CYP1A1, дозозависимо замедляет метаболизм местных анестетиков (лидокаина, ропивакаина), что, возможно, связано с угнетением активности CYP3A4 [29].

Наркотические анальгетики. Чувствительность к наркотическим анальгетикам может зависеть от генетически обусловленной вариабельности μ -опиатных рецепторов (кодируются геном MOR-1). При отсутствии гена MOR-1 морфин утрачивал свое значение. В некоторых работах отмечалась увеличение потребности в наркотических анальгетиках (алфентаниле) при контролируемой пациентом анальгезии у носителей альтернативной формы MOR-1, OPRM-1 [1]. Также известно, что фентанил метаболизируется при участии CYP3A4, CYP3A5. В ряде работ было показано, что носители полиморфного аллеля CYP3A4*1G нуждались в меньшей дозе наркотических анальгетиков в раннем послеоперационном периоде. Однако в доступной нам литературе мы не встретили данных о влиянии каких-либо полиморфизмов на расход наркотических анальгетиков при проведении общей анестезии.

Как видно из данных, приведенных выше, в метаболизме средств, используемых при проведении тотальной внутривенной анестезии, существен-

ную роль играют следующие изоферменты цитохрома: CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4. Остановимся на каждом из них подробнее.

CYP2B6 представляет собой белок, состоящий из 491 остатков аминокислот, с молекулярной массой 56 кДальтон. Ген CYP2B6 находится в 19-й хромосоме, локусе 19q13.2. Синтезируется, в основном, в печени. В настоящее время установлено, что CYP2B6 может метаболизировать около 8% известных лекарственных средств, включая циклофосфамид, тамоксифен, кетамин, невирамин, эфавиренз, бупропион и пропофол [12]. CYP2B6 – один из цитохромов, который участвует в инактивации ряда токсинов и канцерогенов. Этот фермент также принимает участие в метаболизме арахидоновой кислоты, 17- β -эстрадиола, тестостерона. Типичными субстратами CYP2B6 являются высоко липофильные, нейтральные или слабощелочные молекулы. Человеческий CYP2B6 регулируется посредством андростанового рецептора (CAR/NR), который, в свою очередь, при взаимодействии с лигандом может активировать экспрессию CYP2B6. Глюкокортикоидные рецепторы также играют роль в регуляции CYP2B6. Индукция CYP2B6 может частично объяснить некоторые лекарственные взаимодействия. Например, назначение карбамазепина (индуктора CYP2B6) уменьшает плазменную концентрацию бупропиона. Существуют широкие межвидовые различия в активности CYP2B6. Это объясняется генетическим полиморфизмом и влиянием индукторов и ингибиторов CYP2B6. В настоящее время описано 28 аллельных вариантов CYP2B6. Некоторые из них значимо влияют на метаболизм лекарственных средств. Индукция CYP2B6

происходит после лечения циклофосфамидом, рифампицином, блокаторами кальциевых каналов. Наиболее значимые ингибиторы CYP2B6 – клопидогрель и тиклопидин [23].

Семейство CYP3A у человека играет ведущую роль в метаболизме лекарственных средств, при этом наибольшая доля данного семейства представлена CYP3A4 и CYP3A5. Данные ферменты располагаются в печени и тонком кишечнике и участвуют как в системном метаболизме препаратов, так и при первичном прохождении препарата через печень при пероральном применении. CYP3A4 метаболизирует около 60% всех известных лекарственных средств, в том числе все современные средства для тотальной внутривенной анестезии (кетамин, мидазолам, диприван, седуксен). CYP3A4 представляет собой белок, состоящий из 502 аминокислотных остатков, имеющих молекулярную массу 57 кДальтон. Ген CYP3A4 находится в 7-й хромосоме, локусе 7q22.1. Индукция данного изофермента происходит через т.н. «прегнан-Х-рецептор» (белок из класса регуляторов транскрипции) [11]. Активность данных ферментов зависит от целого ряда факторов, таких как состояние гомеостаза, заболевания печени, курение, прием лекарства, диета, генетические мутации. В отличие от других цитохромов (CYP2D6, CYP2C19), т.н. «нулевая» аллель для CYP3A4 не установлена. В настоящее время установлено более 30 вариантов SNP-мутаций CYP3A4 [22]. Для анестезиологии представляет интерес замена аланина на фенилаланин в 305-ом локусе, приводящая к изменению каталитического центра, что, в свою очередь, приводило к снижению скорости окисления диазепама [14].

Однако, как правило, эти мутации являются гетерозиготами с дикой аллелью, в результате чего фармакодинамика лекарственных средств, метаболизируемых при участии данных ферментов, практически не изменяется в отсутствии индукторов или ингибиторов. Установлено, что люди с дефектными аллельными вариантами CYP3A4 чаще болеют раком простаты, некоторыми формами лейкоза, у них чаще наблюдается раннее половое созревание [21]. Маркерными субстратами для определения активности CYP3A4 являются: дапсон, эритромицин, нифедипин, лидокаин, тестостерон, кортизол. Индукторами CYP3A4 являются глюкокортикоиды, барбитураты и многие другие лекарственные вещества. К ингибиторам относятся макролидные антибиотики, а также грейпфрутовый и томатный соки.

Изофермент CYP2C9 представляет собой белок, состоящий из 490 аминокислотных остатков, с молекулярной массой 55 кДальтон. Ген данного фермента находится в 10-й хромосоме, локусе 10q24.1.24.3. Цитохром CYP2C9 синтезируется в клетках печени. Этот фермент участвует в биотрансформации многих НПВС, в т.ч. селективных ингибиторов циклооксигеназы-2, ингибиторов рецепторов ангиотензина, пероральных сахароснижающих средств и многих других. Установлена его роль в биотрансформации бензодиазепинов. Клиническое значение имеют такие аллельные варианты данного изофермента как CYP2C9*2, CYP2C9*3. Установлено, что у носителей данных аллельных вариантов замедлена скорость метаболизма лекарственных веществ, который происходит при участии CYP2C9 [3]. Ингибиторами данного цитохрома являются сульфазеназол и сульфинпи-

разон. Однако убедительных данных об изменении фармакодинамики средств, используемых при проведении тотальной внутривенной анестезии в зависимости от аллельных вариантов CYP2C9, не выявлено.

CYP2C19 – изоэнзим, обеспечивающий метаболизм ряда лекарственных средств, таких как ингибиторы протонного насоса (омепразол, лансопразол, пантопразол), антидепрессантов (имипрамин), бензодиазепинов (диазепам, флунитрозепама), пропранолола и прогуанила. Генетический полиморфизм CYP2C19 в популяции подразделяется на три группы: экстенсивные, промежуточные и медленные метаболизаторы. Полиморфный аллель наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Частота встречаемости различных аллельных вариантов отличается в различных этнических группах. Так, среди восточной популяции медленные метаболизаторы встречаются в 13-23%, в то время как среди кавказской популяции и лиц нигроидной популяции встречаемость медленных метаболизаторов не превышает 5%. Клиническое значение различных генотипов CYP2C19 можно отследить на примере метаболизма протонной помпы. Так, отмечено, что у экстенсивных метаболизаторов скорость метаболизма омепразола больше в 4 раза по сравнению с медленными метаболизаторами [7]. В исследованиях было показано, что у медленных метаболизаторов снижена скорость элиминации диаземапа, однако на пробуждение пациента после анестезии это не влияло [16].

Как видно из обзора, изучение влияния SNP-полиморфизмов может представлять определенный интерес для практической анестезиологии. Более детальное изучение влияния полимор-

физмов генов детоксикации средств для общей анестезии, возможно, со временем позволит индивидуализировать концепцию мультимодальной анестезии, что, в свою очередь, позволит снизить риск анестезиологического последствия.

Список литературы

1. **Волчков В.А., Игнатов Ю.Д., Страшинов В.И.** Болевые синдромы в анестезиологии и реаниматологии – М.: МЕДпресс-информ. 2006.
2. **Каркищенко Н.Н.** Основы биомоделирования – М.: Межакадемическое издательство ВПК. 2004.
3. **Кукес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В.** Метаболизм лекарственных средств, научные основы персонализированной медицины М.: ГЕОТАР-Медиа. 2008.
4. **Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В.** Мир биологии и медицины. Междисциплинарные исследования в медицине – М.: ТЕХНОСФЕРА. 2007.
5. **Симон В.А.** Цитохром P-450 и взаимодействие лекарственных веществ / Материалы VII Российской конференции «Гепатология сегодня». 2002.
6. **Сычев Д.А.** Клиническая фармакогенетика. Клиническая фармакология / под ред. акад. РАМН, проф. Кукеса В.Г. – М.: ГЕОТАР-Медиа. 2004.
7. **Carlos Isaza; Julieta Henao Jose; H Isaza Martinez, Juan C.** Sepulveda Arias, Leonardo Beltran. Phenotype-genotype analysis of CYP2C19 in Colombian mestizo individuals. BMC Clin Pharmacol. 2007; 7:6.
8. **Cheng J.T., Chen R.M.** Mechanisms of ketamine-involved regulation of cytochrome P450 gene expression. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2010. Mar; 6(3): 273-81.

9. **Chorley B. N., Wang X., Campbell M. R., Pittman G.S., Noureddine M.A. Bell D.A.** Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current developing technologies. Mutat. Res. 2008; 659: 147-157.

10. **Crettol S., Petrovic N., Murray M.** Pharmacogenetics of phase 1 and phase 2 drug metabolism. Curr. Pharm. Des. 2010. 16(2); 204-16.

11. **Daly A.K.** Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. Clin Pharmacokinet. 45(1):13-31; 2006.

12. **Desta Z, Xu C., Oqburn E.T., Guo Y.** Effects of the CYP2B6*6 allele on catalytic properties and inhibition of CYP 2B6 in vitro: implication for the mechanism of reduced efavirenz metabolism and other CYP 2 B6 substrates in vivo. Drug Metab Dispos. 2012. 9.

13. **Evans W.E., Johnson J.A.** Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. 2001.

14. **Fowler S.M., Riley R.S., Pritchard M.P., Sutcliffe M.S., Friedberg T., Wolf C.R.** Amino acid 305 determines catalytic center accessibility in CYP3A4. Biochemistry. 18; 39(15):4406-14. 2000.

15. **Garfinkel D.** Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. Arch Biochem. Biophys. 1958. 77. 493-509.

16. **Inomata S., Nagashima A., Itagaki F., Homma M., Nishimura M., Osaka Y., Okuyama K., Tanaka E., Nakamura T., Kohda Y., Naito S., Miyabe M., Toyooka H.** CYP2C19 genotype affects diazepam pharmacokinetics and emergence from general anesthesia. Clin Pharmacol Ther. 2005 Dec;78(6):647-55.

17. **Ingelmen-Sundberg M.** The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005. 207: 52-56.
18. **Kalow W., Tang B.K., Endrenyi T.** Hypothesis: comparisons of inter- and intra-involved variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics* 1998; 8:283-289.
19. **Klingenberg M.** Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem. Biophys.*, 1958. 75. 376-386.
20. **Khokhar J.Y., Tyndale R.F.** Drug metabolism within the brain changes drug response: selective manipulation of brain CYP2B alters propofol effects. *Neuropsychopharmacology.* 2011. Feb. 36(3): 692-700.
21. **Lamba J.K., Lin Y.S., Schuetz E.G., Thummel K.E.** Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Devil Rev.* 2002. Nov 18. 54(10): 1271-94.
22. **Lee S.J., Goldstein J.A.** Functionally defective or altered CYP3A4 and CYP3A5 single nucleotide polymorphisms and their with genotyping tests. *Pharmacogenomics.* 2005. Jun; 6(4): 357-71.
23. **Mo S.L., Liu Y.H., Duan W., Wei M.Q., Kanwar J.R., Zhou S.F.** Substrate specificity, regulation, and polymorphism of human cytochrome P450 2B6. *Curr Drug Metab.* 2009. Sep; 10(7):730-53.
24. **Mossner L.D., Schmitz A., Theurillat R., Thormann W., Mevissen M.** Inhibition of cytochrome P450 enzymes involved in ketamine metabolism by use of liver microsomes and specific cytochrome P450 enzymes from horses, dogs and humans. *Am J. Vet Res.* 2011. Nov; 72(11): 1505-13.
25. **Noppers I., Olofsen E., Niesters M., Aarts L., Mooren R., Dahan A., Kharasch E., Sarton E.** Effect of rifampicin on S-ketamine and S-norketamine plasma concentrations in healthy volunteers after intravenous S-ketamine administration. *Anesthesiology.* 2011. Jun; 114(6): 1435-45.
26. **Ogawa R., Echizen H.** Drug-drug interaction profiles of proton pump inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* 2010. Aug; 49(8): 509-33.
27. **Okkola K.T., Ahonen S.** Midazolam and other benzodiazepines. *Handb Exp Pharmacol.* 2008. (182): 335-60.
28. **Omura, T., Sato, R., Cooper, D.Y., Rosenthal, O., and Estebrook, K.W.** Function of cytochrome P450 microsomes. *Fed. Pron.* 1965. 24. 1181-1189.
29. **Osaka Y., Inomata S., Tanaka E., Nakamura T., Honda K., Miyabe M., Toyooka H., Tanaka M.** Effect of propofol on ropivacaine metabolism in human liver microsomes. *J. Anesth.* 2006. 20(1):60-3.
30. **Peltonieni M.A., Saari T.I., Hagelberg N.M., Reponen P, Turpeinen M., Laine K., Neuvonen P.J., Olkkola K.T.** Exposure to oral S-ketamine is unaffected by itraconazole but greatly increased by ticlopidine. *Clin Pharmacol Ther,* 2011.
31. **Phillips K.A., Veenstra D.L., Oren E. et al.** Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *J.A.M.A.* 2001. 286: 2270-2279.
32. **Restrepo J.G., Garcia-Martin I., Martinez C. et al.** Polimorphic drug metabolism in anaesthesia. *Curr Drug Metab.* 2009. Mar; 10(3): 236-46.
33. **Restrepo J.G., Martinez C., Garcia-Agurdez A. et al.** Cytochrome P450 CYP2B6 genotypes and haplotypes in a colombian population: identification of novel variant CYP2B6 alleles. *Pharmacogenet Genomics* 2011. 21. 773-8.
34. **Sugimoto M., Futura T., Nakamura A., Shirai N., Ikuma M., Misaka S., Uchida S., Watanabe H., Ohashi K., Ishizaki T.,**

Hishida A. Maintenance time of sedative effects after an intravenous infusion of diazepam: a guide for endoscopy using diazepam. *World J. Gastroenterol.* 2008. Sep 7;14(33): 5197-203.

35. **Yanagihara Y., Kariga S., Ohtani M., Uchino K., Aogama T., Yamamura Y.** Involvement of CYP2B6 in n-demethylation of ketamine in human liver microsomes. 2008.

Polymorphism genes of the system xenobiotics detoxication and its role in biotransformation of intravenous anaesthetics

O.A. Maharin, Y.S Maklyakov, V.M. Genilo

Despite of wide arsenal of drugs for narcosis, existing now, quite often the anaesthesiologist is faced with the problem of optimum diagram of anaesthesia. Evaluation age, social, emotional characteristics of patient is often not enough. That is why studying SNP-polymorphisms and their influence on a metabolism of anaesthetics, probably will allow to optimize the concept of «individual approach» in anaesthesiologia.

A substantial part of the individual variability of person response to drugs is related with single nucleotides polymorphisms. Drugs that are used in general anesthesia undergo polymorphic metabolism. Among these, CYP2B6, CYP3A4 and CYP2C9 play a relevant role in the metabolism of ketamine. The enzymes involved in the metabolism of thiopental are still unknown. Propofol is metabolized mainly by glucuronidation by uridine diphosphate-glucuronosyltransferases (UGTs) and by hydroxylation by CYP2B6 and CYP2C enzymes. The enzymes SULT1A1 and NQO1 participate in later steps in propofol metabolism. CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6, CYP2C19 play significant role in later steps in propofol metabolism. CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6, CYP2C19 play significant role in the metabolism of benzodiazepines. The present review analyses the importance of enzymes in the metabolism of anaesthetics.

Key words: pharmacogenetics, intravenous anaesthesia, biotransformation, polymorphisms, allele, cytochromes.



Экспериментальное моделирование остеоартроза коленного сустава у собак

В.Д. Макушин, М.А. Степанов, Т.А. Ступина

ФГБУ Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий, Курган

Контактная информация: к.б.н. Ступина Татьяна Анатольевна StupinaSTA@mail.ru

Представлены результаты экспериментального моделирования остеоартроза у собак путем иммобилизации коленного сустава с пересечением бедренной артерии. Результаты оценки морфофункционального состояния суставного хряща свидетельствуют о развитии дегенеративно-дистрофических изменений, выражающихся гибелью и деструкцией части хондроцитов, нарушением гомогенности межклеточного матрикса и снижением морфометрируемых параметров – толщины хряща, объемной и численной плотности хондроцитов. Отмеченные изменения являются следствием нарушения обменных процессов в суставном хряще, свидетельствующих о снижении синтеза и преобладании катаболических процессов. В данных условиях эксперимента наиболее уязвимыми оказались хондроциты промежуточной зоны, которые равноудалены от васкулярного и синовиального факторов питания.

Ключевые слова: суставной хрящ, моделирование остеоартроза, морфология, морфометрия.

Введение

Существенный вклад в раскрытие механизмов патогенеза остеоартроза вносят исследования суставов животных, подвергшихся различным воздействиям, в результате которых в тканевых компонентах суставов возникают изменения, аналогичные таковым при остеоартрозе у человека [11]. Существует множество методик, позволяющих получить дегенеративные изменения в суставном хряще. Известны способы экспериментального моделирования остеоартроза (ОА) путем воздействия на сустав различных факторов: химических (стероидных препаратов, дексаметазона, папаина и др.); физических (воздействие жидким

азотом); механических (компрессия, иммобилизация сустава) и травматических (дырчатый дефект, рассечение передней крестовидной связки, удаление части мениска и др.) [4, 11]. Выбор того или иного метода зависит от цели исследования. По своей природе остеоартроз – заболевание полиэтиологическое. Ведущая роль в патогенезе ОА принадлежит нарушениям трофики суставного хряща. Гиалиновый хрящ аваскулярен, характеризуется диффузионным типом питания и имеет два источника кровоснабжения: первый – капилляры синовиальной оболочки, второй – капилляры субхондральной кости. Особенностью хрящевой ткани является то, что в ней относительно мало клеток, ко-

торые окружены большим количеством межклеточного матрикса. Хондроциты участвуют в регуляции синтеза и деградации компонентов хрящевого матрикса, эти процессы в норме находятся в сбалансированном состоянии. Обладая интенсивной метаболической активностью, хондроциты чрезвычайно чувствительны к нарушению кровоснабжения сустава [6, 14, 14]. В настоящее время развитие дегенеративно-дистрофических процессов при гонартрозе связывают с нарушением функции сустава и микроциркуляции в суставных концах с последующим развитием застойных явлений [7, 13].

В связи с этим, имеется необходимость совершенствования существующих, а также разработки новых методик экспериментального моделирования деструктивно-дегенеративных изменений, где имелась бы возможность исключения фактора, вызвавшего это заболевание у данной модели, суставы животного были достаточного размера, и имелось максимальное сходство гистологической характеристики тканевых компонентов сустава животного с таковыми характеристиками сустава человека [11].

Цель – с учётом значимости изменений кровоснабжения, статической нагрузки и иммобилизации в патогенезе остеоартроза разработать модель дегенеративно-дистрофических изменений в эпифизах костей коленного сустава собак и оценить морфофункциональное состояние зон суставного хряща и субхондральной кости.

Материалы и методы

Экспериментальное моделирование остеоартроза проводили на взрослых беспородных собаках (n=9) обоего пола, массой 12-15 кг, в возрасте 3-5 лет. Животные получены от населения г. Курга-

на. Содержание собак, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 №755) [9]. Собак содержали в условиях вивария в отдельных вольерах, обеспечивали соответствующим полноценным готовым рационом с учетом двигательной активности и питательного состава кормов. Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены этическим комитетом.

Оперативные вмешательства проводили в условиях операционной, одновременно на обоих коленных суставах экспериментальных животных [7]. После обработки операционного поля, с медиальной поверхности бедра через прямолинейный разрез мягких тканей выделяли бедренную артерию на уровне средней части бедренной кости, лигировали в двух местах и пересекали между лигатурами. Операционную рану ушивали послойно. После этого коленный сустав иммобилизовали аппаратом Илизарова, состоящим из двух дугообразных опор, соединенных шарнирными узлами с резьбовыми хвостовиками. Одна из опор располагалась в нижней трети бедра, другая – в верхней трети голени. В качестве костных фиксаторов использовали спицы Киршнера, по три на каждой опоре. Животных выводили из опыта через 28 суток после окончания иммобилизации.

Рентгенографические исследования проводили на аппарате АРД-2 в двух стандартных взаимно перпендикулярных проекциях (прямой и боковой).

Суставные поверхности оценивали макроскопически (форма, контур, цвет). Для светооптического исследования при-

меняли целлоидиновые срезы мышечков бедра, окрашенные гематоксилином и эозином.

По данным ряда авторов [2, 8], суставной хрящ мышечков бедра является одной из наиболее часто страдающих зон. Учитывая эти данные, в качестве объекта для гистоморфометрического анализа как репрезентативный участок выбран суставной хрящ наружного мышечка бедра. Исследование проведено по перпендикулярным суставной поверхности эпоксидным полутонким срезам большой площади (6-8 мм²), окрашенным метиленовым синим-основным фуксином. Изображения микропрепаратов оцифровывали на аппаратно-программном комплексе «ДиаМорф» (Москва) и анализировали в программе «Видео-Тест-Мастер-Морфология». В качестве контроля исследовали суставной хрящ интактных собак (n=5).

Рельеф суставной поверхности изучали в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) «JSM-840» (Jeol, Япония).

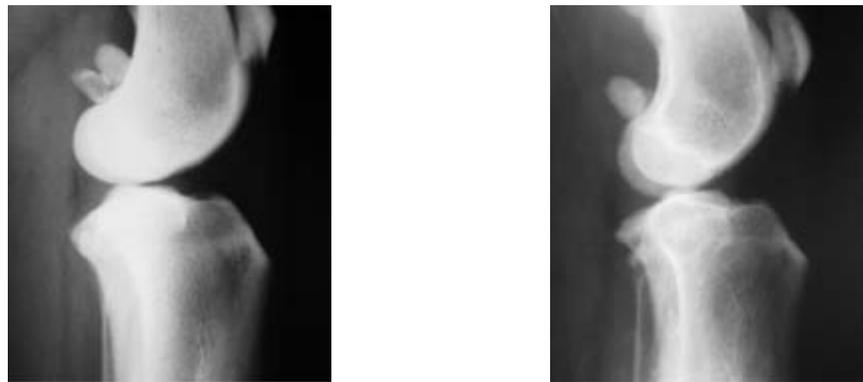
Содержание серы – маркера суль-

фатированных гликозаминогликанов определяли с помощью рентгеновского электронно-зондового микроанализатора «INKA Energy 200» (Oxford Instrumets Analytical, Англия), смонтированного на сканирующем электронном микроскопе «JSM-840».

Анализ цифрового материала был проведен методами описательной статистики. Достоверность различий в зависимости от характера распределения и объема выборок оценивали по критерию Стьюдента и критерию Вилкоксона для независимых выборок с помощью программы AtteStat, версия 1.0 [3] в электронных таблицах Microsoft Excel 97.

Результаты и их обсуждение

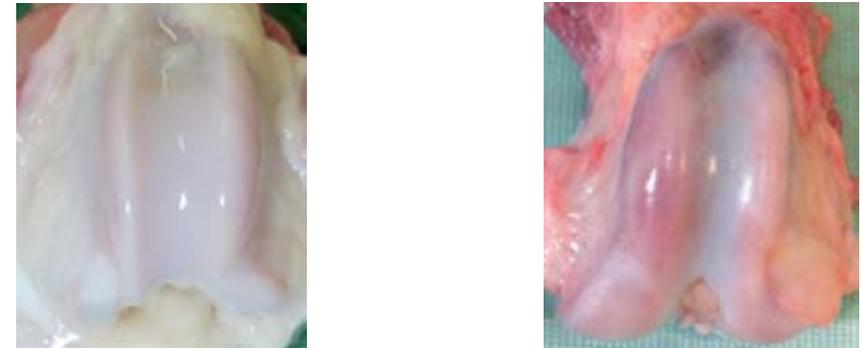
На момент снятия аппарата (28 суток иммобилизации) клинически у животных наблюдалась разгибательная контрактура коленного сустава в пределах 45 градусов. На рентгенограммах определяли сужение суставной щели, остеопороз дистального метафиза бедра, очаговый остеосклероз субхондральной зоны (рис. 1).



А
Рис. 1. Рентгенограммы коленного сустава, боковая проекция. А – до моделирования артроза; Б – после создания модели деформирующего остеоартроза.

Макроскопически суставной хрящ был истончен, неоднородного цвета, с фиолетовыми, красноватыми и синюшными пятнами, глянец отсутствовал (рис. 2Б).

При исследовании суставной поверхности в СЭМ выявлены очаги разволокнения, вскрытые клеточные лакуны (рис. 3А), в части наблюдений поверхностная зона отсутствовала, определялись



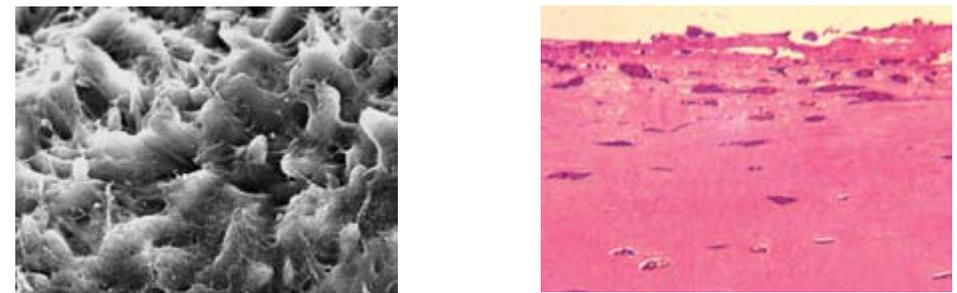
А
Рис. 2. Мышечки бедренной кости: А – интактный сустав, Б – после моделирования остеоартроза.

вскрытые лакуны изогенных групп промежуточной зоны. На полутонких срезах выявлено нарушение гомогенности межклеточного вещества поверхностной зоны со снижением интенсивности его окраски. В очагах разволокнения хондроциты были аномальной формы с пикнотичными ядрами (рис. 3Б).

Во всех зонах хряща резко редуцировано количество клеток. В промежуточ-

ной зоне хрящевые клетки располагались одиночно, изогенные группы отмечены единично, входящие в их состав клетки находились на разных стадиях дегенерации. Основная масса хондроцитов этой зоны находилась в неактивном состоянии или в состоянии гибели и деструкции (рис. 4).

В глубокой зоне часть хондроцитов была гипертрофированна, в них более



А
Рис. 3. а – суставная поверхность. СЭМ. Увеличение x 400. Б – поверхностная зона. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об.40, ок. 12,5.

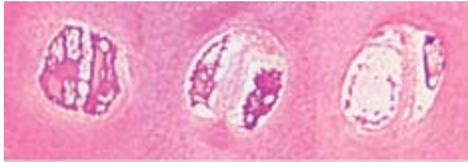


Рис. 4. Хондроциты промежуточной зоны (монтаж). Полутонкий срез, окраска метиленовым синим-основным фуксином. Об.100МИ, ок. 12,5.

50% профиля цитоплазмы было занято крупными скоплениями секреторных гранул и липидными включениями. Выявлено большое количество клеток с признаками дегенерации, пустые клеточные лакуны, лакуны с некротизированными клетками, клеточным детритом. Базофильная линия была неравномерно окрашена, расслоена. В субхондральной зоне выявлен очаговый остеосклероз, наблюдалась агрегация эритроцитов и «предтромбоз» кровеносных сосудов микроциркуляторного русла (рис. 5А). В одних участках на границе с кальцифицированным хрящом наблюдалась активация остеобластов, которые имели интенсивно базофильную цитоплазму (рис. 5Б). В других – отмечены признаки угнетения активности остеобластов, пре-

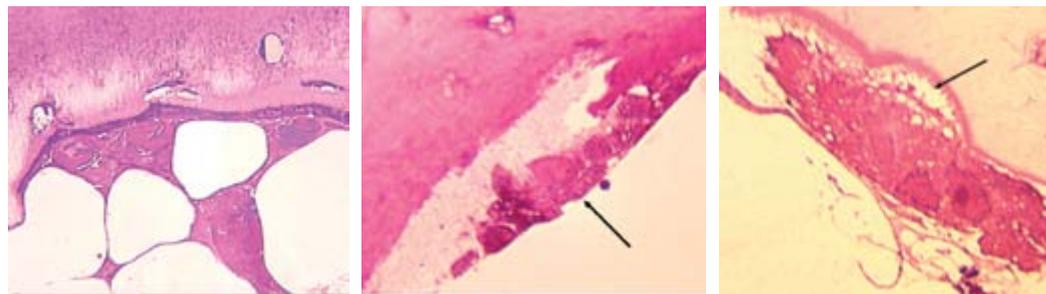


Рис. 5. Граница кальцифицированного хряща и субхондральной зоны. Полутонкий срез. Окраска метиленовым синим-основным фуксином. А – стаз микрососудов субхондральной зоны. Об.40, ок. 12,5. Б – активированные остеобласты на границе с кальцифицированным хрящом (стрелка). Об.40, ок. 12,5. В – остеокласт, резорбирующий основное вещество костной трабекулы. Резорбционная лакуна Хаушипа (стрелка). Об.100МИ, ок. 12,5.

обладания явлений остеокластической резорбции костной ткани (рис. 5В).

Морфометрически выявлено достоверное ($p<0,001$) уменьшение толщины хряща. Обнаружено достоверное ($p<0,05$) снижение численной плотности клеток, объемная плотность хондроцитов почти в 2 раза была ниже нормы. Значительно увеличена доля пустых лакун и изогенных групп в общем объеме выборки (табл.).

С помощью электронно-зондового микроанализа при моделировании ОА обнаружено снижение концентрации серы по сравнению с контролем: в поверхностной зоне в 1,8 раза, промежуточной – в 1,4 раза и глубокой – в 1,7 раза (табл.).

В результате проведенного исследования нам удалось детально проследить морфологическую картину формирования экспериментально созданного деструктивно-дистрофического процесса в коленном суставе у собак. Общеизвестно, что зоны гиалинового хряща коленного сустава собаки и человека сходны по расположению и строению, что важно при экстраполяции экспериментальных данных [5]. При данных условиях экспе-

Количественные характеристики суставного хряща мышелков бедра

Параметры	h (мкм, М±m)	NA _{хц} (М±m)	NA _{пуст.лак} (%)	NAиз. гр (%)	VV _{хц} (% М±m)	ωS (вес.%)
Контроль	475,5±1,34	6,2±0,56	13,6	14,5	9,03±0,46	1,26±0,02
Модель ОА	318,6±2,71	5,3±0,3	43,4	23,8	4,60±0,36	0,70±0,02

Примечание: При определении достоверности различий для параметра h_{хр} использовали критерий Стьюдента ($p<0,001$), для VV_{хц}, NA_{хц} и ωS – критерий Вилкоксона ($p<0,05$). Жирным шрифтом выделены достоверные отличия от контроля.

римента выявленные морфологические изменения суставного хряща – разволокнение суставной поверхности, гибель и деструкция основной части хондроцитов, неравномерное окрашивание межклеточного матрикса – соответствуют начальным стадиям остеоартроза (степень 1-3 по гистологической классификации Международного общества изучения остеоартроза OARSI, 2006) [15].

В субхондральной кости отмечен очаговый остеосклероз, в эпифизе – признаки иммобилизационного остеопороза. Рядом клинических исследований подтверждено, что при остеоартрозе наблюдается увеличение скорости обеих составляющих ремоделирования костной ткани – резорбции и костеобразования. Преобладание какого-либо процесса зависит от стадии заболевания [1].

Наблюдаемые изменения являются следствием нарушения обменных процессов (ремоделирования) суставного хряща, свидетельствующих о снижении синтеза и преобладании катаболических процессов. Выявлено снижение параметров – толщины хряща, объемной и численной плотности хондроцитов, содержания серы, значительно увеличена доля пустых лакун в общем объеме выборки. Известно, что при иммобилизации сустава происходит нарушение диффузионно-на-

грузочного механизма снабжения его трофическими и пластическими веществами, нарушение микроциркуляции всех тканей сустава [11]. Кроме того, в условиях эксперимента было предусмотрено создание гипоксии и ухудшение трофики субхондральной кости (пересечение бедренной артерии). Необходимо отметить, что в данных условиях эксперимента наиболее уязвимым оказались хондроциты промежуточной зоны, которые равноудалены от васкулярного и синовиального факторов питания (около 50% клеток в состоянии деструкции). Известно, что физиологическое самовосстановление структуры суставного хряща осуществляется механизмами интерстициального роста – благодаря постоянно поддерживающейся репродукции хондроцитов в промежуточной зоне [6].

Выводы

Полученные результаты оценки морфофункционального состояния суставного хряща и субхондральной кости показали, что разработанная экспериментальная модель позволяет получить гонартроз, патогенетически основное место в развитии которого занимает фактор изменений режима функциональных нагрузок и кровоснабжения сустава, определяющие диффузное питание хряща.

Разработанная в эксперименте модель дегенеративно-дистрофических изменений в эпифизах костей коленного сустава является патогенетически адекватной клинической картине болезни и может быть использована для изучения самопроизвольного заживления поврежденных тканей суставов, а также испытания средств профилактики и методов лечения гонартроза и остеопороза.

Список литературы

1. **Алексеева Л.И., Зайцева Е.М.** Субхондральная кость при гонартрозе: новые возможности терапии // РМЖ. 2004. Том 12. № 20. С. 1133-1136.
2. **Виноградова Е.В.** Механизмы деструкции и регенерации хряща коленного сустава при гонартрозе // Ортопедия, травматология и протезирование. 2000. № 2. С. 97-98.
3. **Гайдышев И.П.** Анализ и обработка данных: специальный справочник. – СПб.: Питер. 2001. 752 с.
4. **Давыдов В.Б.** Методы экспериментального моделирования гонартрозов у мелких экспериментальных животных. 2008. http://www.alvest.ru/articles/articles/oa_expirim.php
5. **Дервянко И.В.** Морфофункциональная характеристика гиалинового хряща коленного сустава в норме и при хондропластике его экспериментальных повреждений. Автореф. дис... канд. мед. наук. Волгоград. 2004. 16 с.
6. **Мажуга П.М.** Источники трофики и структурного самовосполнения суставного хряща // Морфология. 1999. № 1. С. 43-50.
7. **Макушин В.Д., Степанов М.А., Ступина Т.А.** Способ моделирования остеопороза коленного сустава // Приоритет №2011104885006896, от 09.02.2011.

8. **Макушин В.Д., Чегуров О.К.** Субхондральная туннелизация: вопросы технологии и эффективности лечения при гонартрозе (обзор литературы и собственные данные) // Гений ортопедии. 2006. № 4. С. 99-104.

9. **Маланин Д.А., Писарев В.Б., Черезов Л.Л., Шилов В.Г., Шауки Мохамед А.М.** Пластика полнослойных дефектов покровного хряща коленного сустава цилиндрическими костно-хрящевыми ауто- и аллотрансплантатами малого размера (экспериментальное исследование) // Вестник травматологии и ортопедии. 2000. № 2. С. 16-21.

10. Медицинская диссертация: руководство / авт.-сост. С.А. Трущелев; под ред. акад. РАМН проф. И.Н. Денисова – М.: ГЭОТАР Медиа. 2008. 368 с.

11. **Миронов С.П., Омельяненко Н.П., Шерено К.М., Карпов И.Н., Семенова Л.А., Курьяков А.П.** Морфология тканевых компонентов тазобедренного сустава у экспериментальных животных при моделировании гонартроза // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2006. N 1. С. 57-63.

12. **Стецула В.И., Веклич В.В.** Основы управляемого чрескостного остеосинтеза. - М.: Медицина. 2003. 224 с.

13. **Цурко В.В.** Гонартроз: проблема гериатрии. - М.: Ньюдиамед. 2004. 136 с.

14. **Gilmore Ruth S.C., Palfrey A.J.** Chondrocyte distribution in the cartilage of human femoral condyles // J. Anat. 1988. Vol. 157. P. 23-31.

15. **Mohr W.** On the morphology of normal joint cartilage // J. Clin. Chem and Clin. Biochem. 1986. Vol. 24. P. 915-918.

16. **Pritzker K.P.H., Gay S., Jimenez S.A., Ostergaard K., Pelletier J.P., Revell P.A., Salter D., Path F.R.C., Berg W.B.** Osteoarthritis cartilage histopathology:

grading and staging // Osteoarthritis and Cartilage. 2006. Vol.14. P. 13-29.

Experimental modeling of the knee osteoarthrosis in dogs

V.D. Makushin, M.A. Stepanov, T.A. Stupina

The results of experimental modeling canine osteoarthrosis by the knee immobilization with the femoral artery transection are presented in the work. The results of the assessment of the articular cartilage morphofunctional state evidence the development of degenerative-and-dystrophic changes manifested as the death and destruction of a part of chondrocytes, the disorder of extracellular matrix homogeneity and the decrease of the parameters evaluated by morphometry – cartilage thickness, volumetric and numerical density of chondrocytes. The changes marked appear to be a consequence of metabolic process disorders in the articular cartilage evidencing the decrease of synthesis and the predominance of catabolic processes. Under these experimental conditions the intermediate zone chondrocytes equidistant from the vascular and synovial supply factors turned out to be the most vulnerable ones.

Key words: articular cartilage, osteoarthrosis modeling, morphology, morphometry.



Генетическая модель пародонтоза и коррекция основных признаков заболевания стволовыми и прогениторными клетками костного мозга

О.И. Степанова, О.В. Баранова, Х.Х. Семенов, Н.В. Касинская, Л.Х. Казакова, В.Н. Каркищенко

ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, Московская область

Контактная информация: к.б.н. Ольга Ивановна Степанова scbmt@yandex.ru

Изучен положительный терапевтический эффект культивированных клеток костного мозга на коррекцию патогенетических нарушений пародонтоза у генетических мышей линии BRSUNT.

Ключевые слова: пародонтоз, мыши BRSUNT, стволовые и прогениторные клетки костного мозга.

Пародонтоз – одна из наиболее распространенных и сложных патологий челюстно-лицевой области. Рост заболеваемости пародонтоза свидетельствует, что современная медикаментозная терапия не способна надежно препятствовать возникновению и прогрессированию основных симптомов пародонтоза. Поэтому поиск и разработка новых подходов к лечению пародонтоза остается актуальной проблемой современной медицины.

Цель исследования – изучить возможности коррекции патогенетических нарушений пародонтоза на экспериментальной генетической модели с помощью аллогенных клеток костного мозга от здоровых доноров.

Материалы и методы

Для коррекции основных признаков пародонтоза использовали генетическую модель мышей линии BRSUNT. Эта модель характеризуется генетическим заболеванием зубов и околозубного пространства у 100% животных – опытная группа (n=20).

Контрольную группу составили мыши той же линии (n=20) без введения клеток костного мозга (ККМ).

В опытной и контрольной группах использовали мышей в возрасте 2-3 мес. и 7 мес. после рождения. Для коррекции нарушений пародонтоза у опытных мышей использовали культивированные аллогенные клетки (гемопоэтической и стромальной фракций) костного мозга (КМ) от здоровых доноров мыши линии C57BL10.

Трансплантацию аллогенных ККМ проводили шестикратно, сначала вводили 3-х-кратно с интервалом в 5 дней в количестве 600-650 тыс. гемопоэтические клетки костного мозга (ГПККМ), мононуклеарную фракцию, культивированные в течение 5 сут; затем 3-х-кратно (с интервалом в 7 дней) в количестве 100-150 тыс. культивированные в течение 14 сут мультипотентные мезенхимальные стромальные (фибробластоподобные) ККМ (ММСК КМ).

Введение ККМ проводили внутрибрюшинно, возраст доноров соответствовал возрасту реципиентов, срок наблюдений составил 6 мес. В динамике проводили клинические и гистологические исследования ротовой полости больных животных.

Гистологические методы были применены для исследования зубов нижней и верхней челюсти на декальцированных парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Зубы и кости нижней и верхней челюсти мышей фиксировали в нейтральном формалине с последующей декальцинацией по Шафферу в 7,5% азотной кислоте в течение 2-3 сут. После декальцинации для подавления набухания соединительной ткани кусочки размещали в 5% р-р сернокислого натрия на 24 ч с последующей промывкой и проводкой с заключением в парафин. Резку блоков проводили на микротоме GREICHERT-JUNG толщиной в 6 микрон. Для окраски срезов использовали гематоксилин «Карац» и эозин водоростворимый, а далее заключали в сибирский бальзам. Результаты оценивали на микроскопе фирмы «NIKON» (Япония). Для фотографирования использовали цифровой фотоаппарат фирмы «OLYMPUS» (Япония).

Результаты и их обсуждение

После введения культивированных аллогенных ККМ у мышей BRSUNT наблюдали клиническое и функциональное состояние ротовой полости. При оценке гистологических изменений опытной и контрольной групп мы учитывали изменения тканей десны и зубов опытных животных в разные сроки после введения ККМ.

Клинически при осмотре ротовой полости контрольной группы поражения твердых тканей зуба в виде эрозии эмали и клиновидных дефектов не отмечалось, однако было выявлено у мышей, особенно в возрасте 7 мес. после рождения, выраженное пожелтение (налет) эмали зубов, которое сопровождалось также увеличением щели между резцами и расшатыванием зубов.

После внутрибрюшинного введения ККМ у мышей BRSUNT наблюдали клиническое и функциональное состояние ротовой полости. У мышей опытной группы слизистая оболочка рта розового цвета, не кровоточит, плотно прилегает к зубам. Десневые сосочки, образуя четкую фестончатость, занимают межзубные промежутки в области шеек зубов. Десна плотная, пародонтальные карманы отсутствуют, а зубы плотно прилегают друг к другу.

При гистологическом исследовании у мышей контрольной группы (без введения ККМ) слизистая оболочка десны была покрыта дистрофически измененным многослойным плоским эпителием с признаками атрофии, выраженного гиперкератоза с участками акантолитических тяжей, были выявлены выраженные дистрофические изменения, что проявлялось в уменьшении количества клеток в слоях многослойного плоского эпителия, истончении преимущественно базального

и шиповатого слоев, в расширении рогового слоя. Собственная пластинка слизистой оболочки десны была с признаками выраженного отека соединительнотканых волокон всех слоев (поверхностного сосочкового и более глубокого сетчатого слоя), определялись единичные спавшиеся сосуды капиллярного типа.

У мышей контрольной группы в области костной ткани зубной лунки отмечались дистрофические процессы в виде умеренно выраженной прогрессирующей гладкой резорбции костной ткани. Отмечалось умеренно выраженное истончение костных пластинок межальвеолярных перегородок, расширение костномозговых пространств, так называемое широкопетлистое строение костной ткани, ретракция десны с формированием патологического зубодесневого кармана с расшатыванием зубов (клинически), без макроскопических и микроскопических признаков воспаления. Выстилающий зубодесневый карман эпителий был представлен двумя слоями клеток – поверхностным сосочковым и более глубоким сетчатым, состоящим из несколько уплощенных клеток. Дно десневой борозды находилось ниже уровня эмалево-цементного соединения.

Периодонт был представлен тонким слоем отечных разрыхленных коллагеновых волокон.

На продольном шлифе зубов определялся однородный дентин, обычного строения и толщины. Пульпарная полость, находящаяся внутри зуба, была несколько сужена в области пульпарной камеры, количество пульпы было уменьшено, пульпа представлена рыхлой волокнистой, местами фрагментированной соединительной тканью с единичными сосудами прекапиллярного и капиллярного типов, большая часть

которых находилась в спавшемся состоянии, окружающие сосуды клетки – макрофаги и фибробласты – практически не определялись. Слой одонтобластов был представлен одним рядом кубических клеток, местами расположенных беспорядочно. Слой эмали был истончен, представлен однородной плотной обызвестленной тканью.

У мышей опытной группы (через 1, 3 и 6 мес. после введения ККМ) состояние слизистой оболочки десны было в пределах нормы. Покрывающий десну многослойный плоский эпителий был представлен всеми слоями клеток, с незначительными признаками гиперкератоза (норма). Собственная пластинка слизистой оболочки десны также соответствовала норме, была представлена двумя слоями – поверхностным сосочковым и более глубоким сетчатым. Сосочковый слой был образован рыхлой соединительной тканью, с многочисленными сосудами и нервами. Сетчатый слой был образован более плотной соединительной тканью. Строение десны в области десневой борозды было в пределах нормы, покрывающий ее эпителий представлен двумя слоями несколько уплощенных клеток. Десневая борозда имела вид щелевидного пространства – желобка, неразличимого макроскопически. Дно десневой борозды находилось на уровне эмалево-цементного соединения.

Изменения альвеолярной кости в опытной группе были представлены расширенными многочисленными прободящими каналами и нишами компактной кости, с формированием «лакун», заполненных кровью, однако данные участки чередовались с участками плотной компактной кости.

Периодонт был представлен плотной соединительной тканью, содержащей

многочисленные сосуды прекапиллярного и капиллярного типов, соединительнотканые волокна периодонта полностью заполняли пространство между стенками костных ячеек и веществом цемента зуба, между волокнами периодонта определялись многочисленные мелкие сосуды (артериолы, капилляры), часть из которых образовывала петлевые структуры.

Дентин был обычного строения и толщины. Пульпарная полость была несколько расширена, пульпа полностью заполняла пространство пульпарной камеры, была представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью с многочисленными, расположенными среди волокон клетками гематогенного и гистиоцитарного происхождения, отмечались многочисленные расширенные, полнокровные сосуды микроциркуляторного русла.

В опытной группе отмечались выраженные признаки ангиогенеза вблизи слоя одонтобластов, которые были представлены несколькими рядами (2-3) высоких призматических клеток. Анализ животных в данной группе показал, что сходные изменения тканей десны и зуба были как у более молодых животных (2-3 мес.), так и у старых (7 мес.).

Гистологические исследования показали, что более выраженные положительные клинические результаты были получены через 3 мес. после введения ККМ, что было подтверждено нами гистологически. Позитивная динамика коррекции пародонтоза также сохранялась у животных и через 6 мес. после введения донорских клеток КМ.

Выводы

1. Мыши линии BRSUNT являются адекватной экспериментальной генетиче-

ской моделью пародонтоза, т.к. воспроизводят функциональные и структурные изменения заболевания в челюстно-лицевой области.

2. Выявлено, что выраженность терапевтического эффекта клеток костного мозга у мышей с пародонтозом повышается: при использовании культивированных клеток; в зависимости от кратности введения клеток костного мозга гемопоэтических и стромальных фракций.

3. Установлено, что наиболее гистологически выраженные достоверные изменения были со стороны зубов и тканей десны в опытной группе животных после введения ККМ, обнаруженные изменения включали:

а) состояние десны у опытных мышей приближалось к норме – как со стороны многослойного плоского эпителия, так и со стороны собственной соединительной ткани – с признаками ангиогенеза в виде появления многочисленных сосудов капиллярного и прекапиллярного типов, наблюдается сужение и практическое исчезновение десневого канала;

б) выраженные изменения были выявлены со стороны периодонта у мышей опытной группы, периодонт отличался более плотным компактным строением с наибольшим количеством тонкостенных сосудов и с образованием сосудистых петлевых структур;

в) выраженные изменения мы отмечали со стороны альвеолярной кости. У мышей BRSUNT опытной группы отмечалась резорбция кости, появление участков компактного строения и появление расширенных «лакун», заполненных кровью;

г) изменения пульпы включали появление многочисленных расширенных сосудов капиллярного типа, а также большого количества клеток гематогенного

и гистиогенного происхождения (фибробластов и макрофагов), что соответствует нормальному строению пульпы;

д) мы отмечали увеличение слоев одонобластов обычного строения в данной группе и появление сосудов капиллярного типа вблизи нижнего слоя одонобластов.

4. Выраженное позитивное действие клеточной терапии у животных с пародонтозом на клинические и морфологические проявления заболевания зубов и околозубного пространства связано с длительными сроками сохранения жизнеспособности и функциональной активности донорских клеток костного мозга в организме реципиента после трансплантации.

Genetic model of periodontosis and correction of the main symptoms of a disease by stem and progenitor cells of a marrow

O.I. Stepanova, O.V. Baranova, H.H. Semenov, N.V. Kasinskaya,
L.Kh. Kazakova, V.N. Karkishchenko

The positive therapeutic effect of the cultivated cells of a marrow on correction of pathogenetic violations of periodontosis at genetic mice of the BRSUNT line is studied.

Key words: periodontosis, mice of BRSUNT, stem and progenitor cells of a marrow.

донтозом на клинические и морфологические проявления заболевания зубов и околозубного пространства связано с длительными сроками сохранения жизнеспособности и функциональной активности донорских клеток костного мозга в организме реципиента после трансплантации.

Идентификация нейролептиков – производных бензамида в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Р.А. Калёкин

ФГБУ Российский центр судебно-медицинской экспертизы Минздравсоцразвития РФ,
Москва

Контактная информация: к.ф.н. Калёкин Роман Анатольевич kalyokin@yandex.ru

В настоящей публикации предложен метод идентификации нейролептиков – производных бензамида (амисульприда, сульпирида и тиаприда) в извлечениях из крови. Предложенная методика позволяет с высокой воспроизводимостью и достоверностью проводить идентификацию исследуемых веществ с экстрактивными веществами.

Ключевые слова: нейролептики, амисульприд, сульпирид, тиаприд, кровь, ВЭЖХ.

Введение

В настоящее время в медицинской практике широко используются психотропные лекарственные средства – нейролептики, к которым также относится группа замещенных бензамида. К представителям данной группы относятся: амисульприд, сульпирид, тиаприд, которые применяются для лечения различных форм шизофрении; при психомоторном возбуждении и агрессивных состояниях, особенно при хроническом алкоголизме или в пожилом возрасте; депрессиях различной этиологии; острых маниакальных и маниакально-бредовых состояниях. Достаточно часто встречаются случаи острого и хронического отравления, передозировки этими лекарственными препаратами, а также их немедикаментозное и бесконтрольное применение [1, 2].

Целью нашего исследования явилась разработка методики идентификации в извлечениях из крови наиболее современным и достоверным методом – вы-

сокоэффективной жидкостной хроматографии, поскольку в доступной научной литературе отсутствует информация по исследованию крови и идентификации в извлечениях нейролептиков – производных бензамида и их дифференциальное разделение от сопутствующих веществ. Принципиальным преимуществом пробы крови является возможность более надежно обеспечить ее сохранность, поскольку эта процедура проводится, как правило, опытным врачом [3]. Кроме того, концентрации тех или иных лекарственных веществ в крови легче поддаются интерпретации, чем в моче.

Материалы и методы

Использованный вариант модельной смеси для проведения исследования позволяет максимально приблизить условия эксперимента к реальным и получить биологическую жидкость со связанным лекарственным веществом с форменными элементами крови. Изолирование

нейролептиков – производных бензамида сводилось к следующему: в пробу объёмом 5 мл вводили водный раствор производного бензамида (не более 1 мл) и оставляли для связывания исследуемого вещества с белками крови на сутки при температуре не более 10°C. Далее к модельной смеси крови прибавляли 8 мл 40% раствора натрия бисульфита и 24 мл 15% раствора кислоты хлористоводородной. Солянокислый гидролиз проводили на кипящей водяной бане в течение 30 мин с воздушным холодильником. Раствор после гидролиза оставляли для охлаждения до комнатной температуры, затем прибавляли 8 мл 50% раствора кислоты трихлоруксусной до 7% концентрации для осаждения белковых веществ. Центрифугирование проводили в течение 5 мин при 5000 об./мин, так как фильтрование может привести к ненужным потерям исследуемого вещества. Экстрагирование амисульприда, сульпирида и тиаприда из полученной водной фазы проводили при значении рН среды 12 путём доведения аммиаком водным и добавляли в качестве электролита аммония сульфат до насыщения. Значение рН среды контролировали с помощью универсальной индикаторной бумаги. Экстрагирование проводили трёхкратно, по 20 мл хлороформа в течение 5 мин. Полученные хлороформные извлечения объединяли в фарфоровой чашке и выпаривали в токе теплого воздуха. Полученный сухой остаток растворяли в воде и переносили в мерную колбу на 10 мл либо 25 мл, и доводили объём водой до метки. При проведении предложенной методики изолирования не происходит разрушения исследуемых лекарственных веществ. **Нейролептики – производные бензамида проявляют стойкость структуры молекулы, и предложенные усло-**

вия изолирования не разрушают амисульприд, сульпирид и тиаприд.

Предложенная методика идентификации нейролептиков – производных бензамида проводилась на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» с УФ-детектором производства ЗАО «ЭкоНова» (Россия). Полностью автоматическое устройство позволяло в соответствии с заданной программой обеспечивать выполнение всех циклов: промывки колонки, набор и ввод пробы. Исследование осуществляли на хроматографической колонке размером 2x75 мм, заполненной обращенно-фазовым сорбентом «Силасорб С18». В качестве элюента применяли 0,1% раствор трифторуксусной кислоты (А), ацетонитрил (Б) в градиентном режиме от 10% элюента Б до 80% за 30 мин. Скорость подачи подвижной фазы составляла 100 мкл/мин. Время измерения – 0,18 сек, а температура термостата колонки была равна 35°C. Исследованию подвергали вышеописанные лекарственные вещества (амисульприд, сульпирид и тиаприд) в водном растворе. **Идентификация проводится по нативному соединению, поскольку исследуемые лекарственные средства в организме незначительно подвергаются метаболизму основным продуктом присутствия в крови и выводятся в виде определяемых веществ.**

Результаты и их обсуждение

Прецизионность (воспроизводимость) характеризует случайное рассеяние результатов относительно среднего значения. Для этого проводилась оценка метрологических характеристик. Результаты хроматографирования представлены в табл.

Особой проблемой при идентификации из биологических жидкостей явля-

Результаты хроматографирования амисульприда, сульпирида, тиаприда методом ВЭЖХ

Исследуемый лекарственный препарат	Время удерживания, мин (n=6)
Амисульприд	10,40±0,28
Сульпирид	7,59±0,21
Тиаприд	8,40±0,26

ется ложная положительная реакция, которую могут дать соэкстрактивные вещества. Особой ценностью разработанной методики идентификации ВЭЖХ является четкое разделение соэкстрак-

тивных веществ с исследуемыми веществами, причем выход соэкстрактивных веществ происходит вначале (рис.), а затем определяются нейролептики – производные бензамида.

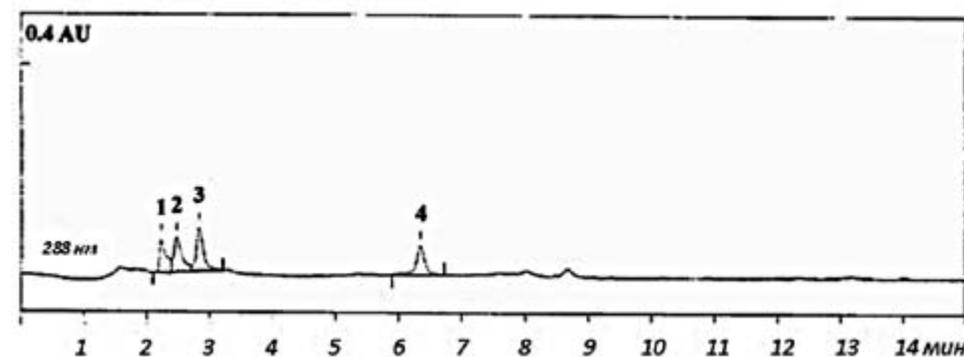


Рис. Хроматограмма извлечения из крови при ВЭЖХ анализе (1-4 – неидентифицированные пики соэкстрактивных веществ).

Выводы

По результатам проведенных исследований предложена методика идентификации нейролептиков – производных

бензамида (амисульприда, сульпирида и тиаприда) в извлечениях из крови, с высокой воспроизводимостью и достоверностью полученных данных.

Список литературы

1. **Калёкин Р.А.** Изучение особенностей использования в практической медицине нейролептиков производных бензамида для целей судебной медицины / Р.А. Калёкин // Экспертъ. 2012. № 2. С. 49-51.

2. **Калёкин Р.А.** Токсикологическая характеристика нейролептиков –

замещенных бензамидов / Р.А. Калёкин, Е.М. Саломатин, В.А. Калёкина // Судеб.-мед. экспертиза. 2007. № 6. С. 31-34.

3. **Суворов А.В.** Справочник по клинической токсикологии / А.В. Суворов – Нижний Новгород: Изд-во НГМА. 1996. 180 с.

Identification of neuroleptics – derivatives benzamide in blood a method of a highly effective liquid chromatography

R.A. Kalyokin

In the present publication the method of identification neuroleptics – derivatives benzamide (amisulprid, sulphirid and tiaprid) in extraction from blood is offered. The offered technique allows with high reproducibility and reliability to carry out identification of studied substances with so-extractive substances.

Key words: neuroleptics, amisulprid, sulphirid, tiaprid, blood, HELC.