

MEDICINE

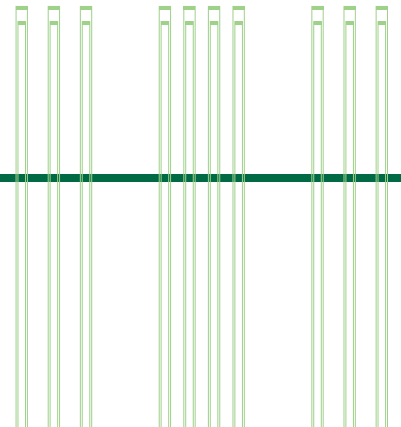
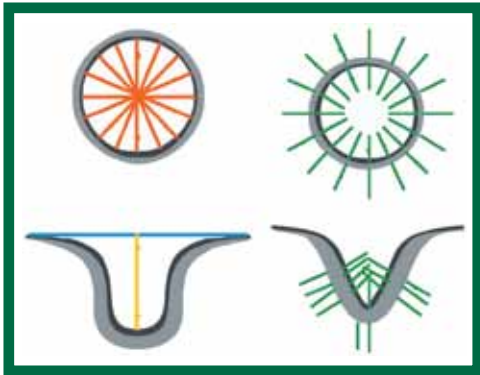
ISSN 2074-5982

2013

1

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ



УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

Вы держите в руках первый номер журнала «Биомедицина» за 2013 год. Мы сообщаем Вам, что основатель журнала: Научный центр биомедицинских технологий – перешел в соответствии с Распоряжением Правительства Российской Федерации от 28 января 2013 года № 62-р в ведение Федерального медико-биологического агентства (ФМБА России).

Федеральное медико-биологическое агентство было образовано в 2004 году на базе Третьего Главного управления при Минздраве СССР, созданного в 1947 году. За годы работы агентства был накоплен огромный опыт и построена уникальная структура обеспечения безопасности персонала на предприятиях с вредными и опасными условиями труда. Работники ФМБА первыми узнают о возможных опасностях внедрения новых технологий, одними из первых приходят на помощь людям в местах техногенных и природных аварий и катастроф.

В соответствии с этим перед нашим Центром стоят новые цели и задачи. При сохранении основных направлений деятельности Центра должна произойти качественная переориентация проводимых исследований на создание моделей животных СПФ-категории с заданными характеристиками, удовлетворяющими требованиям конкретного эксперимента; углубление исследований по спортивной медицине и фармакологии; изучение когнитивных функций и физических методов психокоррекции экстремальных состояний человека; изучение свойств новых веществ, создаваемых на основе нано- и СКФ-технологий. Основной задачей Центра становится разработка средств защиты в целях обеспечения безопасности населения и противодействия терроризму. Центр имеет определенные наработки, материально-техническую базу и квалифицированный научный и научно-вспомогательный персонал, что позволяет разрабатывать новые препараты и проводить их доклинические и клинические исследования. Результаты работ мы собираемся публиковать в нашем журнале.

Мы приглашаем к сотрудничеству наших коллег и надеемся на дальнейшее развитие в указанных направлениях новых оригинальных научных исследований.

С уважением,
редакционная коллегия журнала «Биомедицина»

БИОМЕДИЦИНА

март 2013 № 1

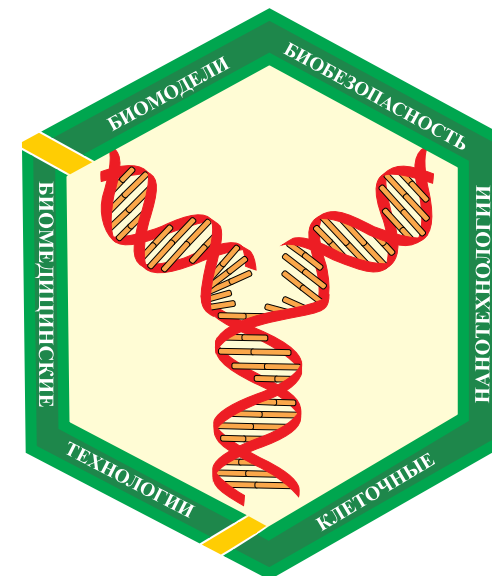
Научный журнал.

Основан в 2005 году ФГБУН «Научным центром биомедицинских технологий ФМБА России»

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

И. А. Березин (д.м.н., проф.), Г. Д. Капаназе (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.),
Е.Б. Шустов (д.м.н., проф.)

Редакционный совет:

член-корр. РАН и РАМН К. В. Анохин, проф. Е. Е. Ачкасов, акад. РАМН и РАСХН В. А. Быков,
акад. РАМН А. М. Дыгай, д.б.н. М. Ф. Киселёв, акад. РАМН А. А. Кубатиев,
акад. РАМН В. Г. Кукес, акад. РАН А. И. Мирошников, акад. РАН и РАМН М. А. Пальцев,
проф. А. С. Радилов, проф. В. Р. Рембовский, 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:

143442, Московская область,
Красногорский р-н, п. Светлые горы,
владение 1
Тел.: 8 (495) 561-52-64

Отпечатано в типографии «Лин-Интер»
127591, Москва, ул. Дубнинская, д. 83а
Подписано в печать 07.03.2013 г.
Тираж 3 000 экз.

©2013, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

Содержание

НОВЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ

- Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов, Г.Д. Капанадзе, Ю.В. Фокин, О.В. Алимкина, А.О. Ревакин, О.И. Степанова, Е.Л. Матвеев, Н.В. Касинская, С.Е. Деньгина**
Эффект пептидов животного происхождения, оцениваемый по чувствительности к гипоксии, некоторым этологическим характеристикам и показателям крови крыс 6

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

- В.В. Гайворонская, С.В. Оковитый, И.Ю. Колышев, Е.Б. Шустов, В.Ц. Болотова**
Влияние бемитила, этомерзола и яктона на процессы регенерации печени после частичной гепатэктомии 16

- Н.Е. Горбатова, С.А. Золотов, Я.О. Симановский, С.М. Никифоров, С.В. Толубев, С.С. Алимпиев, А.В. Гейниц, Н.В. Станкова**
Моделирование абляции биологических тканей излучением импульсно-периодического CO₂-лазера для целей лазерной дерматологии рубцовых деформаций кожных покровов 22

- Т.С. Запорожец, Л.А. Иванушко, А.К. Гажа, Е.В. Михеев, Н.Н. Ковалев**
Влияние фосфорорганических соединений на факторы врожденного иммунитета мышей 36

- Э.А. Манвелян, В.А. Батурич, Н.А. Анисимова**
Гендерные и циркадианные различия в эффектах диазепама у адреналэктомированных и стрессированных крыс при многопараметрическом тестировании 42

- М.Б. Плотников, И.С. Иванов, А.В. Сидехменова, О.И. Алиев, Т.И. Фомина, Л.А. Ермолаева**
Моделирование хронической венозной недостаточности нижних конечностей 55

- Н.А. Язуина, Ю.К. Комлева, А.Б. Салмина, М.М. Петрова, Г.А. Морозова, Н.А. Малиновская, Г.Е. Герцог**
Современные экспериментальные модели депрессии 61

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

- И.А. Дьяченко, Е.А. Калабина, С.Г. Семушина, И.А. Пахомова, Г.А. Осипова, А.В. Лобанов, Э.Р. Шайхутдинова, Г.А. Слащева, Д.А. Бондаренко, В.В. Шерстнев, Д.И. Ржевский, А.Н. Мурашев**
Морфометрические показатели органов свободных от патогенной флоры крыс sd (sprague dawley) в норме 72

- Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко, Л.Х. Казакова, Т.Б. Бескова, З.С. Лушников, И.Ю. Егорова, Е.Л. Матвеев**
Межлинейные различия в чувствительности к острой гипобарической гипоксии у инбредных мышей коллекционного фонда 78

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- L. Bachdasarian, R. Bulthuis, E. Molewijk, S. Guchkov, A. Revyakin**
Enhanced technologies and integration parameters of pre-clinical studies 83

- Н.Н. Каркищенко, Д.Б. Чайванов, Ю.А. Чудина**
Инструментальная коррекция жизненного сценария путем нейромодуляции психофункциональных состояний 98

- А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин, В.Н. Митрофанов**
Оценка влияния некоторых физических факторов на энергетический метаболизм крови in vitro 103

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- С.Л. Кузнецов, М.А. Афанасьев**
Значение гена раннего реагирования c-fos и продуктов его экспрессии в нейронах при различных воздействиях 109

- К.Б. Мирзаев, Д.А. Сычев, В.Н. Каркищенко, А.В. Грачев, Г.П. Князева, Р.Е. Казаков, А.В. Карасёв**
Частота полиморфных маркеров CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 среди русской популяции и сравнение распространенности CYP2C19*2 у пациентов с ишемической болезнью сердца, получающих терапию клопидогрелем, и здоровых добровольцев 117

- И.Е. Грознова, Д.А. Сычев, Н.Г. Бердникова, А.О. Чикало**
Генетические предикторы лекарственной аллергии на бета-лактамы антибиотики 123

Content

NEW REGULATORY PEPTIDES

N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, G.D. Kapanadze, Yu.V. Fokin, O.V. Alimkina, A.O. Revyakin, O.I. Stepanova, E.L. Matveyenko, N.V. Kasinskaya, S.E. Dengina
The effect of peptides of animal origin, as measured by sensitivity to hypoxia, some ethological characteristics and indices of rat blood 6

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

V.V. Gayvoronskaya, S.V. Okovitiy, I.Yu. Kolyshev, E.B. Shustov, V.Ts. Bolotova
Influence bemithyl, etomerzol and yakton on processes of regeneration of hepatic after a partial gepatektom 16

N.E. Gorbatova, S.A. Zolotov, Ya.O. Simanovskiy, S.M. Nikiforov, S.V. Golubev, S.S. Alimpiev, A.V. Geinitz, N.V. Stankova
Ablation of biological tissue by CO₂-laser pulses with different duration 22

T.S. Zaporozhets, L.A. Ivanushko, A.K. Gazha, E.V. Miheev, N.N. Kovalev
Assessing the impact of organophosphorus compounds on the factors of innate immunity of mice 36

E.A. Manveljan, V.A. Baturin, N.A. Anisimova
Gender and circadian differences in the effects of diazepam in adrenalectomized and of stressed rats for testing multiparameter 42

M.B. Plotnikov, I.S. Ivanov, A.V. Sidekhmenova, O.I. Aliev, T.I. Fomina, L.A. Ermolaeva
Model of chronic venous insufficiency in hind limbs 55

N.A. Yauzina, Yu.K. Komleva, A.B. Salmina, M.M. Petrova, G.A. Morozova, N.A. Malinovskaya, G.E. Gertsog
Current experimental models of depression 61

LABORATORY ANIMALS

I.A. Dyachenko, E.A. Kalabina, S.G. Semushina, I.A. Pakhomova, G.A. Osipova, A.V. Lobanov, D.I. Rzhnevsky, V.V. Sherstnev, A.N. Murashev
Morphometric characters of normal specific pathogen-free sd (sprague dawley) rats 72

Kh.Kh. Semenov, N.N. Karkischenko, L.Kh. Kazakova, T.B. Beskova, Z.S. Lushnikova, I.Yu. Egorova, E.L. Matveyenko
Interlinear distinctions in sensitivity to a sharp hypobaric hypoxia at inbred mice of collection fund 78

BIOMEDICAL METHODS

L. Bachdasarian, R. Bulthuis, E. Molewijk, S. Guchkov, A. Revyakin
Enhanced technologies and integration parameters of pre-clinical studies 83

N.N. Karkischenko, D.B. Chayvanov, Yu.A. Chudina
Tool corrections of the vital scenario by neuromodulation of psychofunctional conditions 98

A.K. Martusevich, A.G. Soloveva, S.P. Peretyagin, V.N. Mitrofanov
Estimation of some physical agents action on energy metabolism of human blood in vitro 103

CLINICAL RESEARCHES

S.L. Kuznetsov, M.A. Afanasyev
The values of early response gene c-fos and products of its expression in neurons under different treatments 109

K.B. Mirzaev, D.A. Sychev, V.N. Karkischenko, A.V. Grachev, G.P. Knyazev, R.E. Kazakov, A.V. Karasev
CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 allele and genotype frequencies in clopidogrel-treated patients with coronary heart disease from the Russian population 117

I.E. Groznova, D.A. Sychev, N.G. Berdnikova, A.O. Chikalo
Genetic predictors of a medicinal allergy on beta-lactam antibiotics 123



Эффект пептидов животного происхождения, оцениваемый по чувствительности к гипоксии, некоторым этологическим характеристикам и показателям крови крыс

Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов, Г.Д. Капанадзе,
Ю.В. Фокин, О.В. Алимкина, А.О. Ревякин, О.И. Степанова,
Е.Л. Матвеевко, Н.В. Касинская, С.Е. Деньгина

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

Контактная информация: *акад. РАРАН, чл.-корр. РАМН, д.м.н., проф. Каркищенко Николай Николаевич; e-mail: niknik2808@yandex.ru*

В статье оценивается и анализируется эффект препаратов, оказывающих влияние на способность организма выдерживать предельные физические нагрузки (в частности, резистентность к острой гипоксии) и, следовательно, повышать выносливость и работоспособность. Доклинические испытания на антигипоксическую активность ряда новых химических соединений – пептидов животного происхождения проводились на крысах линии Wistar. Установлено, что все исследуемые препараты обусловили высокую устойчивость экспериментальных животных к острой гипобарической гипоксии (существенное продление жизни на «высоте») – в 7-8 раз превышающую фоновые показатели. Наибольшую антигипоксическую активность на 21-й день после начала курса введения проявили в первой части эксперимента препараты под шифрами Пеп-6, Пеп-5 и Пеп-4, во второй – Пеп-12, Пеп-8 и Пеп-11.

Результаты биохимических и гематологических исследований указывают на отсутствие негативных последствий предельных физических нагрузок на организм крыс и общее положительное влияние исследуемых препаратов.

Антигипоксический эффект сопровождается значительным повышением горизонтальной двигательной активности и изменением лактатного механизма крови.

Таким образом, исследованные препараты являются антигипоксантами, обладают свойством повышать выносливость и работоспособность организма, испытывающего физическую нагрузку. В связи с чем они могут быть рекомендованы в качестве средств стимулирующего действия при работе в экстремальных ситуациях и в условиях высоких физических нагрузок, в том числе в спортивной фармакологии.

Ключевые слова: крысы, острая гипобарическая гипоксия, поведение, двигательная активность, показатели крови, выносливость, работоспособность, антигипоксанта, фармакология спорта.

Гипоксия – явление, которое, согласно современным представлениям, включается в патогенез практически любого заболевания. Гипоксические состояния осложняют течение многих заболеваний различного генеза, являясь важнейшей составляющей самых разнообразных нозологических форм патологии, включающих такие типовые патологические процессы как воспаление, лихорадка,

шок, ДВС-синдром и другие [6, 8, 9]. Несмотря на очевидные различия пусковых механизмов формирования гипоксии экзогенного или эндогенного происхождения, метаболические сдвиги в условиях дефицита кислорода в биологических системах в значительной мере стереотипны [10, 12].

В связи со сложностью механизмов нарушений метаболизма, а, соответственно, структуры и функции клеток в различных органах и тканях при гипоксических состояниях различного генеза, очевидны и чрезвычайные трудности медикаментозной коррекции сдвигов метаболического статуса в условиях гипоксии [1, 11]. К тому же, если учесть, что арсенал лекарственных средств для лечения гипоксического состояния невелик, а имеющиеся антигипоксанта не полностью отвечают требованиям практической медицины из-за низкой эффективности и/или наличия нежелательных побочных действий [3]. Поэтому поиск лекарственных средств для повышения резистентности организма в условиях острой гипобарической гипоксии является актуальной задачей экспериментальной медицины и биологии [2, 4].

Поскольку в доступной нам литературе практически не имеется никаких сведений о влиянии низкомолекулярных белков и пептидов животного происхождения на выносливость и работоспособность (как лабораторных животных, так и человека), мы сочли целесообразным проанализировать данное свойство посредством курса введения лабораторным крысам некоторых пептидных препаратов с еженедельной постановкой теста острой гипобарической гипоксии.

Одновременно, в конце эксперимента были проведены биохимические и гематологические исследования животных,

по определенным показателям которых также можно судить о влиянии тестируемых веществ на выносливость и работоспособность: а именно по количеству эритроцитов и уровню гемоглобина, а также по содержанию глюкозы, лактата, триглицеридов и мочевины в крови.

Косвенно о повышении или понижении работоспособности животных также можно сделать вывод с помощью анализа некоторых составляющих их системного поведения: двигательной активности, указывающей на уровень возбуждения центральной нервной системы (ЦНС), и интенсивности груминга, являющегося показателем комфортного (или дискомфортного) состояния.

На основании изложенного, **целью** настоящей работы являлось исследование эффекта препаратов, оказывающих влияние на способность организма выдерживать предельные физические нагрузки (в частности, противостоять острой гипоксии) и, следовательно, повышать выносливость и работоспособность.

Материалы и методы

Эксперимент проведен в ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России» на крысах линии Wistar, разводимых в филиале «Андреевка» Центра. В опыте и контроле были использованы самки 3-месячного возраста массой 200±20 г, по 6 особей в каждой группе. Крысы содержались в вентилируемых клетках изоляторной системы «RAIR Isosystem» и получали гранулированный комбикорм (производитель – ООО «Лабораторкорм») *ad libitum* [5].

Исследуемые вещества – оригинальные препараты пептидного происхождения, полученные из животного сырья и отличающиеся друг от друга размерами и молекулярной массой (от 500 до 1300 Да). Выделяли пептиды разными

технологическими методами из различных органов сельскохозяйственных животных. Введение всех препаратов осуществлялось ректально, ежедневно, в течение 21 суток. Контрольной группе животных в аналогичном режиме вводился физ. раствор.

Оценку их влияния осуществляли по тесту индивидуальной чувствительности к острой гипобарической гипоксии. Для этого каждую крысу помещали в барокамеру и «поднимали» на «критическую высоту» (11500 м) со скоростью 165 м/с, где она «находилась» до агонального состояния. Исследуемые показатели: ВПП – время первого падения (переход в лежачее положение) животного, характеризующее порог реакции организма на данное воздействие, сек; ВЖ – время жизни на «высоте» (до появления агонального дыхания), сек; ВВП – время восстановления позы после «спуска» животного с «высоты», сек. Мерой оценки чувствительности животного к острой гипобарической гипоксии служило время жизни на «высоте». Сначала проводили фоновое тестирование крыс, а затем на 7-й, 14-й и 21-й день после начала курса введения.

Биохимические показатели крови определяли на биохимическом анализаторе «ChemWell+» (США) с использованием реагентов фирмы «Витал» (Россия) в сыворотке крови без следов гемолиза. Образцы крови, полученные на следующий день после последнего теста, центрифугировали 6 мин при скорости 4000 об./мин и температуре 6°C. Из исследуемых показателей в данном случае нами учитывались:

- триглицериды;
- глюкоза;
- лактат;
- мочевины.

Гематологические показатели периферической крови определяли на анализаторе ВС 3200. В отобранных образцах цельной крови учитывались следующие показатели:

- количество эритроцитов (RBC);
- уровень гемоглобина (HGB);
- гематокрит (HCT).

Регистрация поведенческих компонентов осуществлялась в фоновых замерах и по окончании курса введения препаратов (21-й день), с применением компьютерной системы Laboras (Metris B.V., Нидерланды), в основе которой лежит чувствительная сенсорная пластина, детектирующая движения животного, находящегося в клетке системы [7]. С помощью данной системы вычислялась длительность таких форм поведения как локомоции (горизонтальная активность), неподвижность (иммобилизация), стойки (вертикальная активность), умывание (груминг). Кроме того, оценивалось время так называемых нераспознанных системой Laboras движений. Эпоха анализа составляла 30 мин. Определялось процентное соотношение каждой формы поведения к общей длительности эксперимента, в результатах фиксировались данные по неподвижности, горизонтальной активности и умыванию.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования влияния препаратов на устойчивость организма крыс к острой гипобарической гипоксии представлены в табл. 1.

Согласно данным первой части эксперимента установлено, что все препараты характеризуются высокой антигипоксической активностью. Эффект проявлялся в существенном продлении жизни экспериментальным животным в сравнении с их аналогами в контрольных группах.

Наиболее активными были препараты под шифрами Пеп-6, Пеп-4 и Пеп-5, которые уже после 7 дней введения увеличили продолжительность жизни «на высоте» опытным животным на 216, 245 и 191% соответственно. Препараты под шифрами Пеп-3, Пеп-1 и Пеп-2 за тот же срок действия продлили жизнь «на высоте» подопытных крыс соответственно на 186, 127 и 91%. Антигипоксический эффект всех препаратов сохранился на высоком уровне и в последующие сроки исследований. Так, препарат Пеп-6 на 21 дне введения увеличил «время жизни» животных в опыте относительно 7-го и 14-го дня (у тех же крыс) на 176 и 113%; препарат Пеп-5 – на 46 и 132%; Пеп-2 – на 35 и 124% соответственно и т.д.

В целом, эффективность антигипоксической защиты исследуемых препаратов составила на 21-й день от минимального его значения у Пеп-1 – 3,95 до максимального, у Пеп-6 – 7,5, что озна-

чает увеличение времени жизни на «высоте» животных опытных групп по сравнению с контролем в 4-7 раз.

Во второй части эксперимента использованы препараты, отличающиеся от первых лишь компонентным составом. Результаты проведенного эксперимента представлены в табл. 1. Следует указать, что все препараты, также как и в первой части эксперимента, обусловили высокую антигипоксическую устойчивость у подопытных крыс, которая проявилась в значительном продлении их жизни на «высоте» по сравнению с контрольной группой.

Так, у лабораторных крыс, которым вводили препараты под шифрами Пеп-11, Пеп-8 и Пеп-12, на 7-й день после введения «время жизни» было продлено по сравнению с показателями животных контрольной группы более чем в 2-3 раза, а на 14-й и 21-й дни – в 5 и 7 раз соответственно.

Таблица 1

Оценка антигипоксического эффекта исследуемых препаратов

Препарат	Фон	Время жизни на «высоте», сек			Кoeffициент эффективности защиты		
		7 дней	14 дней	21 день	7 дней	14 дней	21 день
Пеп-1	110±65	250±113	268±204	435±163	2,27	2,44	3,95
Пеп-2	110±65	210±110	348±244	470±180	1,91	3,16	4,27
Пеп-3	110±65	315±70	444±154	515±153	2,86	4,04	4,68
Пеп-4	110±65	280±267	403±241	740±323	3,45	3,66	6,73
Пеп-5	110±65	320±97	508±185	742±222	2,91	4,62	6,75
Пеп-6	110±65	348±244	370±270	787±413	3,16	3,36	7,15
Пеп-7	95±12,5	135±150,0	187±71,3	170±95,0	1,42	1,97	1,79
Пеп-8	95±12,5	183±83,0	533±213,8	655±127,5	1,91	5,60	6,89
Пеп-9	95±12,5	390±79,0	478±98,8	315±195,0	4,10	5,02	3,31
Пеп-10	95±12,5	175±127,5	363±214,4	280±126,7	1,84	3,82	2,95
Пеп-11	95±12,5	214±223,1	477±262,5	650±150,0	2,25	5,02	6,84
Пеп-12	95±12,5	307±69,8	543±101,3	659±67,8	3,23	5,70	6,94

Однако следует отметить, что во второй части эксперимента устойчивость к гипоксии не у всех исследуемых препаратов линейно возрастала в течение курса введения, что было характерно для первой части. Так, во второй части эксперимента антигипоксический эффект препаратов под шифрами Пеп-7, Пеп-10 и Пеп-9 был максимальным на 14-й день курса введения, а затем снизился к 21-му дню: у Пеп-7 на 9%, у Пеп-10 на 23% и у Пеп-9 на 34%.

Вместе с тем, как было выше отмечено, в целом, препараты, используемые и в первой, и во второй части эксперимента, проявили высочайшую антигипоксическую активность, продлив время жизни «на высоте» экспериментальным крысам на сотни процентов по сравнению с результатами, полученными в контрольной группе.

Результаты биохимического исследо-

вания представлены в табл. 2.

Мочевина, один из конечных продуктов распада белков, выделяется из организма через почки, вместе с мочой, поэтому содержание мочевины в крови и в моче позволяет судить о функции почек. Снижение концентрации мочевины в крови может указывать на некоторые заболевания печени (например, цирроз). Мочевина является продуктом распада тех белков, которые в организме человека содержатся преимущественно в мышцах. При повышенном распаде белков в мышцах уровень мочевины в крови повышается, что может свидетельствовать о перенагрузках. Из табл. 2 видно, что уровень мочевины не выходит за пределы нормы, которую отражают данные контрольной группы, а при применении Пеп-5, 6, 8, 11, 12 уровень мочевины снижается. По-видимому, это связано с ан-

тигипоксическим действием препаратов, приростом мышечной массы.

Более половины энергии, которую расходует наш организм, образуется за счет окисления глюкозы, основного показателя углеводного обмена. При физических нагрузках уровень глюкозы в организме несколько повышается, для обеспечения мышц необходимой энергией.

Лактат – фермент, участвующий в процессе окисления глюкозы и образовании молочной кислоты. Лактат (соль молочной кислоты) образуется в клетках в процессе дыхания. ЛДГ (лактатдегидрогеназа) содержится почти во всех органах и тканях, особенно много его в мышцах. При увеличении выносливости этот показатель прогрессивно снижается. Таким образом, можно сказать, что исследуемые вещества повышают вы-

носливость, особенно ярко данный эффект прослеживается на препаратах под шифрами Пеп-5, 6, 8, 11, 12.

При физических нагрузках необходимо присутствие триглицеридов в мышечной ткани для использования их в качестве источника энергии для клеток. Снижение триглицеридов в крови характерно для физических нагрузок, однако резкое снижение этого показателя может свидетельствовать об истощении запасов энергии в организме. Из полученных результатов видно, что препараты поддерживают нормальный уровень триглицеридов в крови. Даже незначительное снижение этого показателя говорит о повышении выносливости за счет превращения жиров в энергию и наращивания мышечной массы.

Результаты гематологического исследования представлены в табл. 3.

Таблица 2

Биохимические показатели крыс, принимавших исследуемые препараты

Препарат	Показатель			
	Мочевина	Глюкоза	Лактат	ТГ
Контроль	320,4±3,1	5,28±0,15	19,2±2,6	70±4,1
Пеп-1	318,5±2,9	5,30±0,16	20,5±3,2	73±4,5
Пеп-2	325,7±3,2	5,29±0,16	21,0±3,6	75±4,7
Пеп-3	330,1±4,4	5,31±0,18	19,8±2,9	73±4,5
Пеп-4	322,0±3,5	5,30±0,17	19,5±2,7	69±3,9
Пеп-5	316,4±2,8	5,33±0,20	17,5±1,7	65±3,5
Пеп-6	315,1±2,3	5,34±0,22	17,8±1,9	64±3,4
Пеп-7	324,5±3,7	5,31±0,19	19,9±3,0	71±4,3
Пеп-8	319,9±3,0	5,35±0,24	18,6±2,2	67±3,6
Пеп-9	321,7±3,2	5,29±0,16	20,3±2,3	72±4,3
Пеп-10	322,8±3,3	5,28±0,15	21,1±3,5	70±4,1
Пеп-11	317,3±2,7	5,34±0,22	17,9±1,9	66±3,6
Пеп-12	318,9±2,9	5,32±0,21	18,7±2,2	68±3,7

Таблица 3
Гематологические показатели крыс, принимавших исследуемые препараты

Препарат	Показатель		
	Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л	Гематокрит, %
Контроль	10,2±0,60	180±10	51,4±4,8
Пеп-1	10,1±0,58	180±10	51,2±4,6
Пеп-2	9,8±0,56	179±9	51,3±4,7
Пеп-3	10,0±0,57	178±8	51,5±4,9
Пеп-4	9,9±0,56	181±11	51,4±4,7
Пеп-5	9,5±0,50	180±12	50,8±4,3
Пеп-6	9,4±0,49	179±9	50,6±4,2
Пеп-7	10,3±0,61	182±13	51,0±4,5
Пеп-8	9,8±0,58	178±8	50,7±4,4
Пеп-9	10,4±0,62	184±17	51,5±4,9
Пеп-10	10,1±0,58	181±12	51,7±5,0
Пеп-11	10,0±0,57	179±9	50,8±4,3
Пеп-12	9,8±0,58	183±15	50,9±4,4

Главная функция эритроцитов – основной компонента крови – перенос кислорода. При избыточных нагрузках количество эритроцитов может сокращаться, из-за истощения ресурсов организма, поэтому данный показатель необходим для оценки выносливости. Из табл. 3 видно, что препараты оказывали положительное влияние на поддержание постоянства состава крови.

Гемоглобин – железосодержащий пигмент крови – в организме выполняет функцию переноса кислорода из органов дыхания к тканям, играет также важную роль в переносе углекислого газа от тканей в органы дыхания. Этот показатель также незначительно колеблется, что указывает на отсутствие негативных последствий влияния нагрузок на организм.

Гематокрит – соотношение объемов эритроцитов и плазмы – характеризует

степень недостатка или избытка красных кровяных телец в крови (зависит от количества и объема эритроцитов и является расчетной величиной). При интенсивных физических нагрузках нетренированный организм может терять жидкость, при этом гематокрит, количество эритроцитов и гемоглобин повышаются. При повышении выносливости увеличивается объем циркулирующей крови за счет увеличения объема плазмы. Полученные данные свидетельствуют о том, что существует тенденция к снижению гематокрита, т.е. повышению выносливости животных опытных групп.

Результаты исследования системного поведения животных отражены в табл. 4.

Полученные значения указывают на то, что по окончании курса введения тестируемых препаратов во всех опыт-

ных группах отмечается тенденция к повышению горизонтальной активности, длительности умывания и снижению времени неподвижности по сравнению с фоновыми данными. Аналогичная тенденция наблюдается и в контрольной группе животных, однако эти отличия не столь существенны как в опытных группах. Наиболее ярко указанный эффект (снижение иммобилизации и повышение локомоций более чем в несколько раз) прослеживается в группах препаратов под шифрами Пеп-4, 5, 6 (на первом этапе эксперимента) и Пеп-8, 11 и 12 (на втором этапе), что согласуется с результатами вышеописанных исследований.

Таким образом, анализ некоторых составляющих системного поведения крыс позволяет заключить, что их двигательная активность достаточно высока, отмечается возбуждение ЦНС, но данное состояние при этом является для животных комфортным. Следовательно, это может указывать на повышающий работоспособность и выносливость эффект применяемых препаратов.

Заключение и выводы

Согласно полученным в тесте на чувствительность к острой гипобарической гипоксии данным, все исследуемые препараты проявили высокую антигипоксическую активность, что выразилось в существенном продлении жизни подопытным животным на «высоте» в сравнении с фоновыми показателями. Наибольшей активностью среди исследуемых препаратов в первой части эксперимента обладали препараты под шифрами Пеп-6, Пеп-5 и Пеп-4, коэффициенты эффективности защиты которых на 21-й день курса введения составили 7,15; 6,73 и 6,75 соответственно. Это означает, что под влиянием

исследованных препаратов время жизни на «высоте» экспериментальным крысам было продлено более чем в 7 раз. Во второй части эксперимента в этот же период исследования также почти в 7 раз увеличилось время жизни на «высоте» животных, которым вводились препараты под шифрами Пеп-8, Пеп-11 и Пеп-12.

1. Результаты биохимических исследований показали нахождение в пределах нормы и некоторое снижение содержания триглицеридов и мочевины в крови, преимущественное снижение уровня лактата и повышение содержания глюкозы, что указывает на здоровое состояние животных, повышение их выносливости за счёт сжигания жиров, наращивания мышечной массы, обеспечения энергией, а также подтверждает антигипоксическое действие препаратов.

2. Гематологическими исследованиями определено, что количество эритроцитов и гемоглобина в крови опытных животных соответствует нормальным значениям, а гематокрит имеет тенденцию к снижению, что указывает на отсутствие негативных последствий влияния нагрузок на организм крыс и общее положительное влияние исследуемых препаратов.

3. Анализ системного поведения крыс выявил тенденцию к повышению горизонтальной активности, длительности умывания и снижению времени неподвижности по сравнению с фоновыми данными. Этот эффект указывает на возбуждённое состояние ЦНС животных, что косвенно подтверждает антигипоксическое и повышающее выносливость и работоспособность действие исследуемых препаратов.

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что некото-

Таблица 4

Некоторые этологические показатели крыс, принимавших исследуемые препараты

Препарат / Показатель	Неподвижность, %		Горизонтальная активность, %		Умывание, %	
	Фон	21 день	Фон	21 день	Фон	21 день
Контроль	45	40	13	16	19	22
Пеп-1	30	19	11	25	18	21
Пеп-2	32	14	16	24	18	23
Пеп-3	36	29	13	22	17	19
Пеп-4	49	26	9	24	20	20
Пеп-5	57	35	6	22	11	15
Пеп-6	41	20	4	23	18	23
Пеп-7	44	33	12	24	18	19
Пеп-8	52	21	7	22	24	28
Пеп-9	26	17	14	26	9	23
Пеп-10	23	18	11	24	14	25
Пеп-11	49	28	5	23	20	24
Пеп-12	55	26	4	22	15	21

рые пептиды животного происхождения обладают антигипоксическим эффектом, способны повышать выносливость и работоспособность животных, поэтому они могут быть рекомендованы в качестве средств стимулирующего действия при работе в экстремальных ситуациях и в условиях высоких физических нагрузок, в том числе для применения в спортивной медицине.

Список литературы

1. **Виноградов В.М., Смирнов А.В.** Антигипоксанты – важный шаг на пути разработки фармакологии энергетического обмена // Антигипоксанты и актопротекторы: итоги и перспективы. – СПб., 1994. – Вып. 1. – С. 23.
2. **Новиков В.С., Гаранчук В.В., Шустов Е.Б.** Физиология экстремальных состояний. 1998. 248 с.
3. **Оковитый С.В.** Клиническая фармакология антигипоксантов // Клиническая фармакология. Избранные лекции. – М.: ГЭОТАР-Медиа. 2009. 602 с.
4. **Огороков А.И.** Диагностика болезней сердца и сосудов. – М.: Мед. лит., 2004. – Т.8. – 432 с.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль–2С, 2010, 358 с.
6. **Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Матвеевко Е.Л., Капанадзе Г.Д.** Влияние острой гипобарической ги-

поксии 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 // Биомедицина. – 2012. – № 3. – С. 73-78.

7. **Фокин Ю.В.** Влияние пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения на вокализацию крыс в ультразвуке // Биомедицина. – 2012. – № 2. – С. 84-91.
8. **Шевченко Ю.Л.** Гипоксия. Адаптация. Патогенез. Клиника. – СПб.: ЭЛБИ, 2000. – 384 с.
9. **Янковская Л.В., Зинчук В.В., Лис М.А.** Кислородтранспортная функция крови и дисфункция эндотелия у больных со стенокардией и артериальной гипертензией // Кардиология. – 2007. – №4. – С. 22-27.
10. **Balaban R.S.** Modeling mitochondrial function // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2006. Vol. 291. № 6. P. 1107-1113.
11. **Ly J.V., Zavala J.A., Donnan G.A.** Neuroprotection and thrombolysis: combination therapy in acute ischaemic stroke // Expert Opin Pharmacother. 2006. V.7. №12. P. 1571-1581.
12. **Vo T.D.** Building the power house: recent advances in mitochondrial studies through proteomics and systems biology // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2007. V. 292. №1. P. 164-177.

The effect of peptides of animal origin, as measured by sensitivity to hypoxia, some ethological characteristics and indices of rat blood

N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, G.D. Kapanadze, Yu.V. Fokin, O.V. Alimkina, A.O. Revyakin, O.I. Stepanova, E.L. Matveyenko, N.V. Kasinskaya, S.E. Dengina

The paper evaluated and analyzed the effect of drugs that affect the body's ability to withstand the limit physical activity (eg, resistance to acute hypoxia) and, therefore, increase endurance and performance. Preclinical testing antihypoxic activity of new chemical compounds - animal peptides were performed on rats of Wistar. Found that all study drugs resulted in high resistance of experimental animals to acute hypobaric hypoxia (significant prolongation of life on the "height") - is 7-8 times higher than the background rate. Antihypoxic greatest activity at 21 days following initiation of administration have shown in the first part of the experimental drugs under the code Pep-6, Pep-5 and Pep-4, in the second - Pep-12, Pep-8 and Pep-11.

The results of biochemical and hematological studies indicate no adverse effects of extreme physical stress on the body of rats and an overall positive effect of study drug.

Antihypoxic effect is accompanied by a significant increase in horizontal motor activity and changes in the mechanism of blood lactate.

Thus, the investigated drugs are antihypoxants have the property to increase endurance and stamina, experiencing physical stress. In this connection, they can be recommended as a means of stimulating action when working in extreme situations and under conditions of high physical activity, including sports pharmacology.

Key words: rats, sharp hypobaric hypoxia, behavior, physical activity, blood counts, endurance, efficiency, antihypoxants, sports pharmacology.



Влияние бемитила, этомерзола и яктона на процессы регенерации печени после частичной гепатэктомии

В.В. Гайворонская¹, С.В. Оковитый², И.Ю. Колышев³, Е.Б. Шустов²,
В.Ц. Болотова²

¹ – Кафедра фармакологии Военно-медицинской академии, Санкт-Петербург

² – Кафедра фармакологии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии, Санкт-Петербург

³ – Федеральный медицинский центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Контактная информация: Болотова Вера Цезаревна, vera.bolotova@pharminnotech.com

В эксперименте показана способность синтетических адаптогенов 2-этилтиобензимидазола (бемитила) и 5-этоксид-2-этилтиобензимидазола (этомерзола), а также сукцината моно-(2-диметиламино)-этилового эфира янтарной кислоты (яктона) ускорять процессы регенерации печени после частичной гепатэктомии. Под действием изучаемых препаратов выявлено достоверное увеличение прироста массы печени, увеличение содержания в ней суммарных нуклеиновых кислот и гликогена, улучшение функционального состояния, которое проявляется снижением уровня билирубина в крови и уменьшением длительности гексеналового сна, отражающего активность микросомального окисления. Установлено позитивное влияние бемитила, этомерзола и яктона на морфологическую картину печени и процессы внутриклеточной регенерации. Репаративная активность всех изучаемых средств превосходит эффект комбинации известных стимуляторов процессов регенерации - производных пуриновых и пиримидиновых оснований рибоксина и оротата калия.

Ключевые слова: бемитил, этомерзол, яктон, регенерация печени.

Введение

Изучение процессов регенерации печени является важным направлением современной биологии и медицины, что связано не только с большой частотой травматических, токсических и инфекционных поражений органа, но и с тем, что печень является одним из немногих органов, обладающих уникальной способностью к репаративной регенерации. Среди лекарственных средств с гепатотропной активностью наиболее широкое применение нашли как препараты рас-

тительного, так и синтетического происхождения. Эти соединения, как правило, обладают одновременно несколькими видами фармакологической активности (репаративной, антиоксидантной, антигипоксической, мембраностабилизирующей), однако часто их эффективность при тех или иных заболеваниях печени является недостаточной. Цель настоящего исследования состояла в изучении в качестве активаторов репаративной регенерации препаратов нового класса синтетических адаптогенов – бемитила

и этомерзола (производных 2-меркаптобензимидазола), стимулирующих синтез белка и нуклеиновых кислот [2, 5], а также яктона – производного янтарной кислоты, оптимизирующего энергетический обмен [7].

Материалы и методы

Опыты проведены на 960 беспородных белых крысах-самцах массой 130-200 г. Частичную гепатэктомию производили под эфирным наркозом по методу G.M. Haggins и R.M. Anderson [9]. Опытным группам животных внутрибрюшинно вводили один из препаратов: бемитил/этомерзол в дозе 12,5 мг/кг или яктон в дозе 25 мг/кг. Оптимальные дозы препаратов были установлены в предварительной серии экспериментов. Контрольная группа получала инъекции физиологического раствора. Препараты вводили на следующий день после операции, а затем ежедневно в течение 7 дней. В качестве референсного препарата использовали комбинацию двух нестероидных анаболиков – рибоксина и оротата калия (50 мг/кг каждого препарата), для которых доказана способность ускорять процессы регенерации в поврежденной печени. Для количественной оценки процессов регенерации печени вычислялся коэффициент полноты регенерации по следующей формуле:

$$K = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100\%,$$

где P1 – масса печени через 7 дней после частичной гепатэктомии, P2 – масса оставшейся печени после частичной гепатэктомии, P3 – масса удаленной печени.

Исходная масса печени вычислялась по массе тела животного, поскольку эти

показатели линейно связаны [8]. Функциональное состояние печени оценивалось по продолжительности гексеналового сна, отражающего состояние микросомальной окислительной системы. Гексенал вводили внутрибрюшинно в дозе 80 мг/кг [10]. Кроме того, в крови определяли активность аланин- (АлАТ) и аспартатаминотрансфераз (АсАТ), уровень общего билирубина, мочевины, общего белка и глюкозы. Все биохимические исследования выполнены на автоматическом биохимическом анализаторе «SMA-12/16» (Technicon instruments corporation, США).

В ткани печени с помощью гистохимических методик определяли содержание суммарных нуклеиновых кислот и гликогена: срезы окрашивали гемоксилином и эозином по Ван-Гизону, Эйнарссону, Малори [8] и ШИК-реакцией [3]. Ультраструктурные изменения в клетках печени изучали на электронном микроскопе «JEM-100 CX» (JEOL, Япония). Результаты исследований обработаны методами вариационной статистики с применением пакета прикладных программ «Statgraphics» на персональном компьютере IBM PS/AT.

Результаты и их обсуждение

Результаты изучения эффектов препаратов на модели частичной гепатэктомии печени представлены в табл. 1. Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее эффективным средством активации репаративных процессов в печени является бемитил. Он достоверно (на 44%) увеличивал коэффициент полноты регенерации органа, на 21% снижал длительность гексеналового сна, на 25% уменьшал уровень билирубина в крови, значительно повышал содержание суммарных нуклеиновых кислот (на 46%) и гликогена (на 60%) в ткани печени. Вто-

рым по эффективности оказался этомерзол, увеличивший коэффициент полноты регенерации на 28%, снизивший длительность гексеналового сна на 26%, уровень АсАТ – на 23%, а билирубина – на 50%. В ткани печени он на 43,9% повышал содержание гликогена и на 31% – суммарных нуклеиновых кислот. Яктон также ускорял процессы регенерации печени, но в меньшей степени по сравнению с бемитилом и этомерзолом. Он увеличивал коэффициент полноты регенерации на 22%, снижал продолжительность гексе-

налового сна на 37%, активность АсАТ – на 13%, уровень билирубина – на 25% и на 24% повышал содержание гликогена в печени. Все изучаемые препараты превосходили по своему действию комбинацию рибоксина с оротатом калия.

Гистологическое исследование под световым микроскопом показало полноценность регенерации печени после частичной гепатэктомии на фоне действия изучаемых препаратов, отсутствие каких-либо нежелательных феноменов. При введении бемитила, этомерзола, як-

Таблица 1

Эффекты бемитила, этомерзола, яктона и комбинации рибоксина с оротатом калия на модели частичной гепатэктомии ($X \pm m$)

Показатели	Интактные животные	Контроль, физ.раствор	Бемитил, 12,5 мг/кг	Этомерзол, 12,5 мг/кг	Яктон, 25 мг/кг	Рибоксин/оротат калия, 100 мг/кг
Продолжительность гексеналового сна, мин	22,3 ± 1,0	55,9 ± 3,5**	44,5 ± 4,5*	41,7 ± 0,6*	35,3 ± 3,0*	50,2 ± 6,5
Печень: Коэффициент полноты регенерации, %	–	100,0 ± 5,26	144,0 ± 2,92*	128,0 ± 1,21*	122,0 ± 4,03*	108,0 ± 5,09*
Суммарные нуклеиновые кислоты, усл.ед.	0,205 ± 0,004	0,208 ± 0,001	0,364 ± 0,006*	0,273 ± 0,006*	0,201 ± 0,001*	0,255 ± 0,03*
Гликоген, усл.ед.	0,258 ± 0,004	0,267 ± 0,006	0,429 ± 0,01*	0,380 ± 0,014*	0,332 ± 0,003*	0,295 ± 0,04*
Сыворотка крови: АсАТ, У/л	154,0 ± 3,2	162,0 ± 11,9	163,0 ± 5,7	125,7 ± 5,0*	142,0 ± 1,0	156,0 ± 0,9
АлАТ, У/л	45,3 ± 1,7	42,5 ± 2,4	40,3 ± 1,1	38,0 ± 2,3	43,7 ± 3,3	55,0 ± 1,0*
Общий билирубин, мкмоль/л	2,05 ± 0,02	6,84 ± 0,03**	5,13 ± 0,03*	3,42 ± 0,03*	5,13 ± 0,01*	5,99 ± 0,2*
Азот мочевины, нмоль/л	11,64 ± 0,49	11,78 ± 0,04	9,28 ± 0,99*	9,30 ± 0,14*	9,28 ± 0,36*	9,64 ± 0,21*
Глюкоза, ммоль/л	7,30 ± 0,12	7,33 ± 0,13	6,88 ± 0,16	7,66 ± 0,02	7,64 ± 0,12	7,58 ± 0,09
Общий белок, г/л	65,5 ± 0,7	70,1 ± 2,0	65,7 ± 1,0	67,3 ± 0,9	70,1 ± 1,0	70,5 ± 0,6

Примечание: ** – достоверное ($p < 0,05$) отличие от соответствующего показателя интактной группы животных;

* – достоверное ($p < 0,05$) отличие от соответствующего показателя контрольной группы животных.

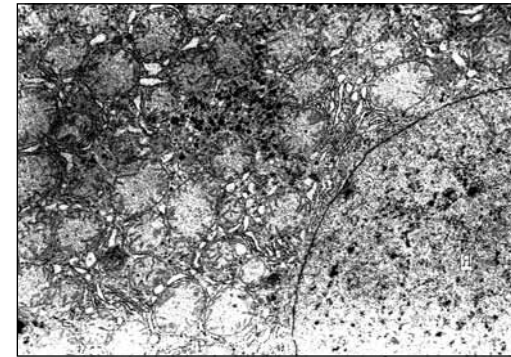


Рис. 1. Ультраструктурные изменения гепатоцитов после частичной гепатэктомии. Увеличение количества митохондрий, признаки гиперплазии гранулярного эндоплазматического ретикулума. Увеличение × 15000.

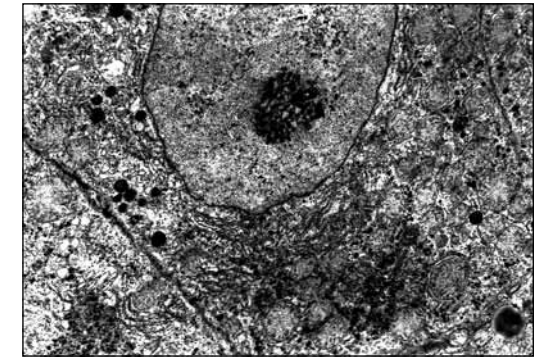


Рис. 2. Ультраструктурные изменения гепатоцитов после частичной гепатэктомии при действии бемитила. Увеличение числа ядрышек, появление точечного гетерохроматина. Увеличение × 15000.

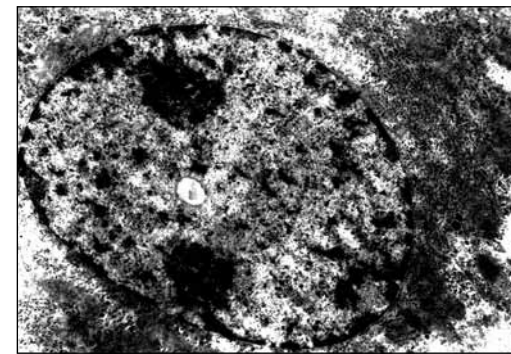


Рис. 3. Ультраструктурные изменения гепатоцитов после частичной гепатэктомии при действии этомерзола. Гипертрофия ядрышек, появление обширных зон гетерохроматина, признаки гиперплазии гранулярного эндоплазматического ретикулума. Увеличение × 15000.

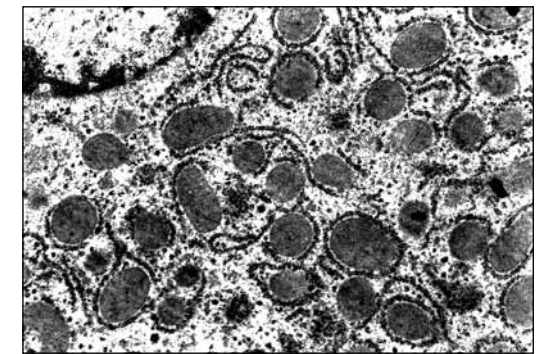


Рис. 4. Ультраструктурные изменения гепатоцитов после частичной гепатэктомии при действии яктона. Большое количество митохондрий с высокой электронной плотностью, признаки гиперплазии гранулярного эндоплазматического ретикулума. Увеличение × 15000.

тона и комбинации рибоксина с оротатом калия изменений в гистологической картине печени по сравнению с контрольной и интактной группой не было обнаружено: гепатоциты обычной формы и размеров, располагающиеся в виде двух тесно прилегающих друг к другу рядов, образуя печеночные балки. Некротические и воспалительные изменения отсутствовали.

В то же время были получены морфологические доказательства различий в механизмах действия бемитила и это-

мерзола, активаторов синтеза нуклеиновых кислот, и яктона, оптимизирующего энергетический обмен в клетке. При анализе данных электронномикроскопического исследования выявлено участие внутриклеточных структур гепатоцитов в адаптационных и компенсаторных реакциях. В контрольной группе животных отмечалась гиперплазия цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, увеличение содержания гликогена в гепатоцитах. При введении бемитила

и этомерзола изменения наблюдались, прежде всего, в структуре ядра. На фоне действия бемитила на срезе ядра присутствовало увеличенное число ядрышек – не менее двух. Ядрышки компактные, с хорошо выраженными фибриллярными и гранулярными компонентами. Вдоль ядерной мембраны наблюдалось присутствие «точечного» активного хроматина. В цитоплазме по сравнению с контролем гиперплазирован гранулярный эндоплазматический ретикулум. Этомерзол вызывал появление обширных зон гетерохроматина как вдоль ядерной мембраны, так и в центральных частях ядра. Кроме того, имела место гипертрофия ядра, гипертрофия ядрышек и увеличение их количества. Увеличение количества ядрышек, накопление и перераспределение гетерохроматина, гиперплазия гранулярного эндоплазматического ретикулума указывает на активацию протеинсинтетических процессов бемитилом и этомерзолом [1].

Отличительной особенностью гепатоцитов при введении яктона являлись изменения в цитоплазме клеток, выражавшиеся, прежде всего, в состоянии эндоплазматического ретикулума и митохондрий. При этом строение ядра не отличалось от контроля. В опытной группе в ряде исследованных гепатоцитов отмечалось увеличение количества митохондрий и изменение их электронной плотности. Параллельно с изменениями митохондрий в цитоплазме наблюдалось разрастание единичных цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума. Проявлялся, кроме того, очень интересный феномен – своеобразное «обрастание» гранулярного эндоплазматического ретикулума митохондрий, что позволяет предположить усиление функциональной связи энергопродуцирующего митохондриального окисления с энергопотребля-

ющим синтезом белка на рибосомах эндоплазматического ретикулума.

Таким образом, все исследуемые препараты способствуют ускорению регенерации печени после частичной гепатэктомии, причём по своей активности они превосходят известные стимуляторы регенерации – рибоксин с оротатом калия в оптимальной комбинации. Наиболее выраженный положительный эффект вызывает препарат бемитил. Он обеспечивает в печени самую заметную активацию синтеза белка, наиболее быстрый прирост массы резецированного органа. Такой эффект является логическим следствием известного действия бемитила, заключающегося в синтезе РНК и, вторично, белка [5].

Выводы

1. Новые лекарственные препараты – производные 2-меркаптобензимидазола бемитил и этомерзол, и производное янтарной кислоты яктон – существенно ускоряют процессы регенерации печени после частичной гепатэктомии, превосходя по своей эффективности известные стимуляторы регенеративных процессов – нестероидные анаболики рибоксин с оротатом калия в оптимальной комбинации.

2. Положительный эффект бемитила и этомерзола основывается на известном принципиальном механизме действия производных 2-меркаптобензимидазола – активации генома с результирующим усилением синтеза нуклеиновых кислот и белка.

3. Позитивный эффект яктона как производного янтарной кислоты – важнейшего субстрата цикла Кребса – связан с усилением функционального взаимодействия энергопродуцирующего митохондриального окисления с энергопотребляющим синтезом белка на рибосомах.

Список литературы

1. *Блюгер А.Ф., Залутат В.И., Карташова О.Я.* Ультроструктурная патология печени. Зинатне. Рига. 1989. 318 с.
2. *Оковитый С.В.* Протеинсинтетические и иммунные механизмы защитно-репаративных эффектов гепатотропных эффектов гепатотропных средств: Автореферат дис. канд. мед. наук. С.-Пб. 1995. 24 с.
3. *Пирс Э.* Гистология: пер. с англ. Изд. иностр. литературы. М. 1962. 962 с.
4. *Рычнев В.Е., Фролов В.М.* Стимуляторы регенерации в терапии вирусного гепатита и других заболеваний печени. Изд-во Воронеж. Госуниверситета. Воронеж. 1984. 126 с.
5. *Смирнов А.В.* Физиологически активные вещества. Выпуск 25. Киев. 1993. С. 5-9.
6. *Солопаев Б.П.* Регенерация нормальной и патологически изменённой печени. Волго-вят. кн. изд., Горький. 1980. 240 с.
7. *Спивакова Р.П., Бобков Ю.Г., Томчин А.Б. и др.* Фармакологическая регуляция физической и психической работоспособности. М. 1980. С. 35-36.
8. *Шустов Е.Б., Катков В.Ф., Гайворонская В.В.* Сборник изобретений и рацпредложений ВМедА им. С.М. Кирова. Выпуск 21. 1990. Ленинград. 93 с.
9. *Haggins G.M., Anderson R.M., Arch. Pethol, 12 (1), 1931. P. 188-202.*
10. *Verly W.C.* The control of liver growth. New York. Chalmers. 1976. 112 p.

I.Yu. Kolyshv,

Bemithyl, ethomerzol and yakton effects on liver regeneration after partial hepatectomy

V.V. Gayvoronskaya, S.V. Okovitiy, I.Yu. Kolyshv, E.B. Shustov, V.Ts. Bolotova

The experiment shows the ability synthetic adaptogens 2 ethyltiobenzimidazol (bemithyl) and 5-ethoxy-2-ethyltiobenzimidazol (ethomerzol) and succinate mono-(2-dimethylamino)-ethyl succinate (yakton) to speed up the processes of liver regeneration after partial hepatectomy. Under the effect of the studied medicine showed a significant increase in liver weight gain, increasing its content of total nucleic acids and glycogen, improved functional status, which is manifested by reduced levels of bilirubin in the blood and a decrease in duration of hexenal sleep, reflecting the activity of microsomal oxidation. Found positive impact bemithyl, ethomerzol and yakton on liver morphology and intracellular processes of regeneration. Reparative activity of all studied medicine surpasses the effect of combination known stimulators of processes regeneration – derivatives of purine and pyrimidine bases ryboksin orotate and potassium.

Key words: bemithyl, ethomerzol, yakton, liver regeneration.

Моделирование абляции биологических тканей излучением импульсно-периодического CO₂-лазера для целей лазерной дермабразии рубцовых деформаций кожных покровов

Н.Е. Горбатова¹, С.А. Золотов¹, Я.О. Симановский², С.М. Никифоров²,
С.В. Голубев², С.С. Алимпиев³, А.В. Гейниц⁴, Н.В. Станкова⁵

¹ – НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы, Москва

² – ООО «Энергомаштехника», Москва

³ – ФГБУН Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

⁴ – ФГУ «ГНЦ лазерной медицины ФМБА России», Москва

⁵ – ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России», Московская область

Контактная информация: Золотов Сергей Александрович, zolotov-sergey@yandex.ru

Проблема устранения рубцовых деформаций кожных покровов продолжает оставаться актуальной и в настоящее время. Лазерная дермабразия, реализуемая физическим механизмом абляции, является наиболее эффективным и перспективным для этих целей методом.

Проведено сравнение эффективности абляции модельных биологических тканей лазерным излучением с использованием импульсно-периодического CO₂-лазера с поперечным разрядом и непрерывного CO₂-лазера с модуляцией выходного излучения.

На основании выполненного моделирования абляции показано, что импульсно-периодический CO₂-лазер с длительностью импульса 20 мкс и мощностью в импульсе более 2 кВт реализует оптимальный режим абляции, гарантирующий прецизионное, послойное и параллельное поверхности испарение тканей при минимальном термическом повреждении их по периферии зоны воздействия по сравнению с модулированным излучением непрерывного лазера с мощностью 50 Вт и длительностью импульса 500 мкс.

Определена перспектива приоритетного применения метода лазерной дермабразии излучением импульсно-периодического CO₂-лазера для устранения рубцовых деформаций кожных покровов у взрослых больных и детей.

Ключевые слова: CO₂-лазер, лазерная абляция, биоткань.

Введение

В кожно-пластической реконструктивно-восстановительной хирургии устранение различных посттравматических и послеожоговых рубцовых деформаций кожных покровов продолжает оставаться актуальным. В настоящее время лазерная дермабразия, реализуемая физическим механизмом абляции, – наиболее эффективный и перспективный метод для этих целей.

Моделирование абляции биологических тканей излучением разрабатываемого в ООО «Энергомаштехника» совместно с Институтом общей физики им. А.М. Прохорова РАН нового импульсно-периодического CO₂-лазера показало, что при длительности импульса 20 мкс и энергии в импульсе 20–40 мДж реализуется оптимальный режим абляции, гарантирующий прецизионное, послойное

и параллельное поверхности испарение тканей при минимальном термическом повреждении их по периферии зоны воздействия.

Таким образом, в клинической практике кожно-пластической реконструктивно-восстановительной хирургии метод лазерной дермабразии излучением импульсно-периодического CO₂-лазера, несомненно, должен стать методом выбора при устранении посттравматических и послеожоговых рубцовых деформаций кожных покровов у взрослых больных и детей.

Лазерную медицинскую аппаратуру на основе непрерывных углекислотных лазеров (CO₂-лазеров) давно и эффективно применяют для целей хирургии в различных областях медицины [5, 13, 17, 18, 19, 22, 23, 24].

Излучение непрерывных CO₂-лазеров бесконтактно обеспечивает необходимую диссекцию тканей, антибактериальное действие, профилактику метастазирования и хороший гемостаз, за счет образования выраженной краевой зоны термической коагуляции [13, 17, 22, 8, 14, 21].

Воздействие непрерывного излучения на ткань основано на довольно медленном нагреве облучаемой области, приводящем к испарению тканевой жидкости и, далее, к горению относительно сухой ткани. Медленный нагрев области воздействия приводит к диффузии тепла из облучаемой зоны, выраженному эффекту коагуляции и значительному термическому повреждению близлежащей ткани [13, 17].

Однако в некоторых областях хирургии часто возникают задачи, решение которых невозможно при использовании непрерывного CO₂-лазера. В первую очередь, это кожно-пластическая реконструктивно-восстановительная

хирургия, где при ряде хирургических вмешательств и манипуляций требуется послойное и прецизионное удаление патологических тканевых структур с сохранением жизнеспособности близлежащих тканей [10, 11, 23, 27–31].

Это актуально при устранении методом лазерной дермабразии различных посттравматических и послеожоговых рубцовых деформаций кожных покровов, особенно у пациентов детского возраста, с учетом их возрастных особенностей и большого количества травматических случаев, связанных с термическим механизмом повреждений [4, 6, 7, 9, 23, 25].

Для вышеуказанной клинической задачи наиболее перспективным режимом воздействия излучения CO₂-лазеров на биологическую ткань является режим абляции, когда удаление ткани происходит в строго ограниченном слое без термического повреждения ее по периферии зоны испарения [2, 10, 17, 23, 32].

Физический механизм лазерной абляции может быть реализован только при воздействии импульсного лазерного излучения на обрабатываемую биологическую ткань [2, 6, 7, 32].

Импульсно-периодический CO₂-лазер с поперечным разрядом

Для медицинских целей в ООО «Энергомаштехника» совместно с Институтом общей физики им. А.М. Прохорова РАН разрабатывается новый импульсно-периодический CO₂-лазер с поперечным разрядом, защищенный патентами РФ [15, 16]. Физические характеристики этого лазера ориентированы на реализацию оптимального режима абляции биологических тканей [1, 2, 3, 32]. Общий вид макета лазерного аппарата, создаваемого для использования в клинической практике, приведен на рис. 1.

Экспериментальные исследования

С целью уточнения надежности конструкции макетного образца импульсно-периодического CO₂-лазера с поперечным разрядом, определения особенностей воздействия и эффективности режима абляции его излучения, а также возможностей его клинического применения в кожно-пластической реконструктивно-восстановительной хирургии для целей лазерной дермабразии было выполнено экспериментальное исследование по моделированию абляции биологических тканей.

Экспериментальное оборудование и материалы

Для экспериментов использовались два CO₂-лазера – макетный образец импульсно-периодического CO₂-лазера и серийный непрерывный CO₂-лазерный хирургический аппарат «Ланцет-2» [2, 21, 22].

Импульсно-периодический CO₂-лазер с поперечным разрядом (длина волны 10,6 мкм) обеспечивал длительность импульса 20 мкс, энергию в импульсе от 20 до 40 мДж, частоту следования импульсов от 1 до 50 Гц при пиковой мощности в импульсе более 2 кВт [2].

Непрерывный CO₂-лазерный хирургический аппарат «Ланцет-2» (длина волны 10,6 мкм) использовали в режиме импульсной модуляции выходного излучения с длительностью импульса 500 мкс при мощности лазера 50 Вт, энергии в импульсе 25 мДж и частоте следования импульсов от 1 до 50 Гц [21].

Излучение лазеров фокусировалось линзами с фокусным расстоянием 100 мм.

Диаметр пятна лазерного излучения на обрабатываемой поверхности составлял 0,8–1 мм для обоих лазеров.

Результаты воздействия излучения на поверхности модельных биологиче-



Рис. 1. Общий вид макетного образца импульсно-периодического CO₂-лазера с поперечным разрядом.

ских тканях (листьях растений) анализировали при помощи Цифрового USB микроскопа System Anyview MV200UA. Измерение линейных размеров лазерных кратеров выполняли с использованием программного обеспечения микроскопа. Поперечные срезы области воздействия получали при помощи лезвия Gillette Rubie platinum. При анализе экспериментального материала было использовано увеличение 200х.

Результаты воздействия каждого режима лазерной абляции анализировали на 6-ти кратерах, полученных в одинаковых условиях. Схема замеров кратеров после воздействия лазерного излучения приведена на рис. 2.

В качестве моделей экспериментальных объектов были выбраны листья растений с различной плотностью: листья Сансевиерия (Sansevieria) плотностью 0,99 г/см³, листья Каланхоэ (Kalanchoe daigremontiana) плотностью 0,85 г/см³ и образцы охлажденной кожи мини-свиней

светлогорской популяции, которая имеет наибольшее сходство с кожей человека по строению [26]. У животных этой породы соотношение между площадью поверхности тела и его массой равно человеческому показателю, кроме того, они имеют белую кожу, короткая способна загорать, что дает возможность исследовать на них проблемы радиационной токсикологии и биологической защиты от радиации [12]. Все эксперименты выполняли *in vitro*.

Эксперимент

В эксперименте были изучены результаты воздействия излучения импульсно-периодического CO₂-лазера с поперечным разрядом на биологические ткани экспериментальных объектов, а также проведено сравнение их с результатами воздействия на эти же объекты модулированного импульсного излучения непрерывного CO₂-лазера.

Эффективность абляции биологических тканей оценивали на основании определенных реальными клиническими условиями объективных критериев, включающих объем и форму кратера, размер зоны и выраженности термического периферического повреждения, а также возможности режима сканирования.

Результаты и их обсуждение

В первом разделе экспериментальных исследований были изучены результаты воздействия излучения импульсно-периодического CO₂-лазера на поверхность листьев Сансевиерия и Каланхоэ, сопоставление их с соответствующими данными, полученными при использовании непрерывного CO₂-лазера, а также смоделирован эффект абляции в режиме сканирования излучения импульсно-периодического CO₂-лазера.

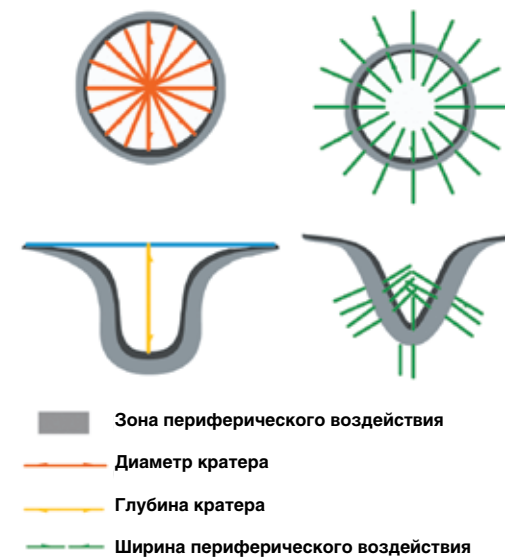


Рис. 2. Схема замеров кратеров после воздействия лазерного излучения.

На рис. 3 (А, Б) приведены фотографии кратера, образующегося на поверхности листа, после разового воздействия импульсно-периодического CO₂-лазера с пиковой мощностью более 2 кВт и длительностью 20 мкс. Кратер отличается плавным дугообразным профилем с уплощенным дном, соответствующим распределению плотности энергии в пятне лазерного излучения. Глубина кратера, полученного за один импульс излучения, составляет 300 мкм. Известно, что поглощение излучения на длине волны 10,6 мкм в биологических тканях в основном определяется водой, всегда присутствующей в них. Коэффициент поглощения воды на длине волны 10,6 мкм составляет порядка 10³ см⁻¹, то есть излучение поглощается на глубине порядка 10 мкм [17, 20]. Глубина формируемого при импульсном воздействии кратера в 30 раз превышает длину поглощения излучения.

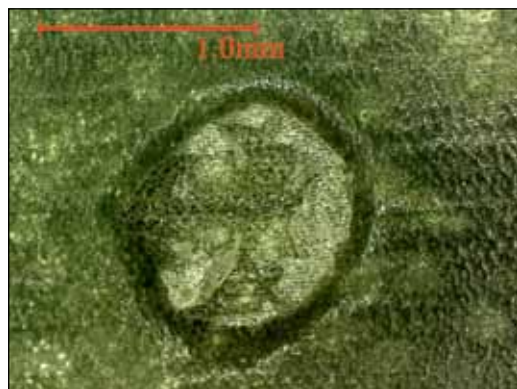


Рис. 3А. Абляция листа Сансевиерия одиночным импульсом излучения импульсно-периодического CO₂-лазера (энергия 40 мДж, длительность 20 мкс). Вид сверху. Ув. 200 X.

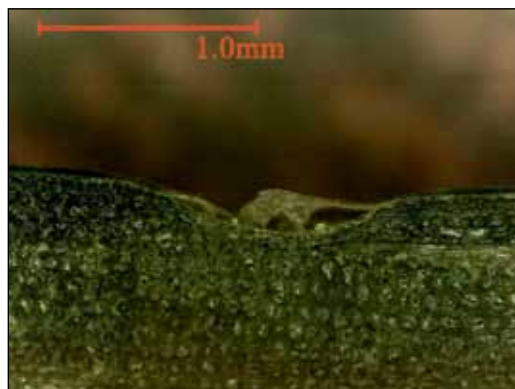


Рис. 3Б. Абляция листа Сансевиерия одиночным импульсом излучения импульсно-периодического CO₂-лазера (энергия 40 мДж, длительность 20 мкс). Поперечное сечение по диаметру кратера. Ув. 200 X.

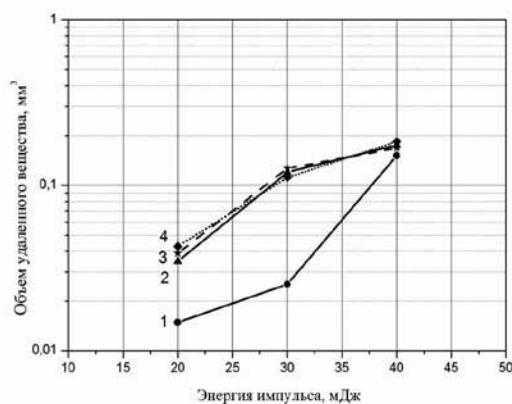


Рис. 4. Зависимость объема удаленного вещества листа Каланхоэ от энергии лазерного импульса длительностью 20 мкс для различного расстояния от точки фокуса до поверхности: 1 – 1 мм; 2 – 6 мм; 3 – 11 мм; 4 – 21 мм.

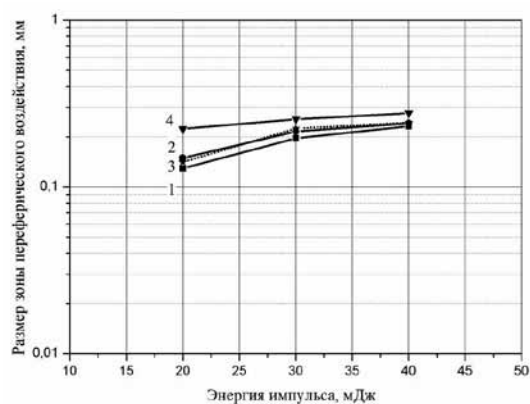


Рис. 5. Зависимость радиального размера зоны периферического воздействия на образце листа Каланхоэ от энергии лазерного импульса длительностью 20 мкс для различного расстояния от точки фокуса до поверхности: 1 – 1 мм; 2 – 6 мм; 3 – 11 мм; 4 – 21 мм.

На рис. 4 показана зависимость объема удаленного вещества от энергии лазерного импульса для различного расстояния от указателя выходного устройства лазера до поверхности объекта. Точка фокуса соответствует расстоянию 19 мм от указателя выходного устройства. Из полученных данных (рис. 4) следует, что при максимальной энергии выходного излучения 40 мДж допустимое отклонение от точки фокуса линзы, не приводящее к

изменению режима абляции, составляет 18 мм. При таком или меньшем отклонении количество удаляемого за импульс вещества остается постоянным, и режим воздействия излучения на ткань не меняется.

На рис. 5 приведена зависимость размера зоны периферического термического воздействия от энергии одиночного лазерного импульса для различных расстояний от наконечника до поверхности

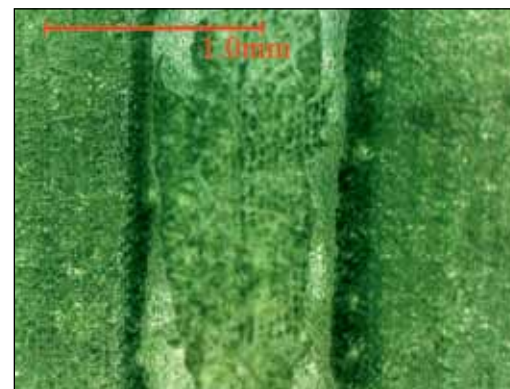


Рис. 6А. Воздействие излучения импульсно-периодического CO₂-лазера с энергией в импульсе 40 мДж и длительностью 20 мкс на лист Каланхоэ в режиме сканирования. Вид сверху. Ув. 200 X.

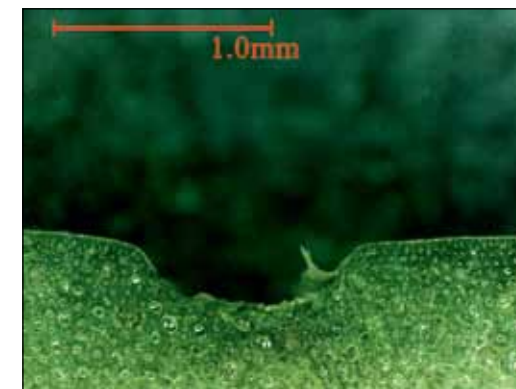


Рис. 6Б. Воздействие излучения импульсно-периодического CO₂-лазера с энергией в импульсе 40 мДж и длительностью 20 мкс на лист Каланхоэ в режиме сканирования. Поперечное сечение области воздействия. Ув. 200 X.

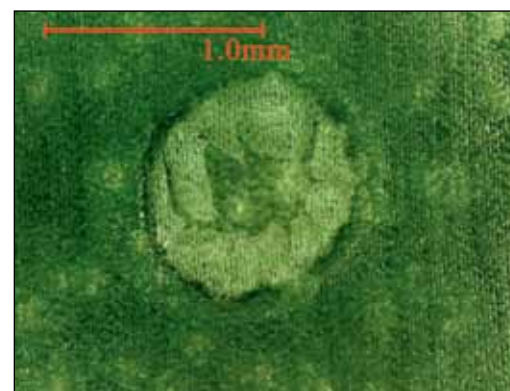


Рис. 7А. Результат воздействия 1 импульса на лист Сансевиерия импульсно-периодического CO₂-лазера с энергией 30 мДж и длительностью 20 мкс. Вид сверху. Ув. 200 X.



Рис. 7Б. Результат воздействия 1 импульса на лист Сансевиерия лазера «Ланцет-2» с энергией 25 мДж и длительностью 500 мкс. Вид сверху. Ув. 200 X.

листа. Полученные данные подтвердили, что зона периферического термического воздействия в режиме абляции практически не зависит от параметров лазерного излучения и составляет 0,15-0,25 мм. Такое минимально возможное для CO₂-лазерного излучения с длиной волны 10,6 мкм. Термическое повреждение не удаленных тканей является одним из важных показателей оптимизации режима абляции для клинического применения.

На рис. 6 (А, Б) представлены фотографии результата моделирования на листе Каланхоэ лазерной послойной абляции излучением импульсно-периодического CO₂-лазера с энергией в импульсе 40 мДж, в ручном режиме сканирования, с перекрытием на ¼ зоны воздействия, при небольшой частоте следования импульсов в диапазоне от 2 до 5 Гц. Во всех случаях после воздействия лазерного излучения в режиме сканирования было отмечено

формирование линейного по отношению к поверхности кратера. Размеры кратера и зоны периферического воздействия слабо зависели как от частоты следования и энергии импульса, так и от расстояния от указателя до обрабатываемой поверхности, и были близки к параметрам, полученным в разовом импульсном режиме. В случае перекрытия пятен на частоте следования импульсов 50 Гц карбонизация тканей не была отмечена.

На рис. 7 (А, Б) приведены результаты однократного воздействия на лист растения Сансевиерия излучения сравнимых CO_2 -лазеров, при сопоставимых режимах излучения: воздействие 1-го импульса излучения импульсно-периодического CO_2 -лазера с энергией 30 мДж и длительностью импульса 20 мкс (рис. 7А) и воздействие 1-го импульса излучения лазерного хирургического аппарата «Ланцет-2» с энергией 25 мДж и с длительностью импульса 500 мкс (рис. 7Б). Было отмечено, что короткий импульс 20 мкс приводит к взрывному разрушению более сухого верхнего слоя биоткани толщиной в несколько мкр и формированию кратера, а воздействие длинного импульса с длительностью 500 мкс вызывает только высушивание поверхности, видимое как изменение цвета, без выноса вещества.

Воздействие серии из 10 импульсов излучения разной длительности на одну точку обрабатываемой ткани демонстрирует значительную зависимость результатов воздействия от длительности лазерного импульса (рис. 8А, Б).

При длительности импульса 20 мкс (импульсно-периодический лазер) кратер сохраняет плавные дугообразные контуры. Термически измененные ткани на его стенках и дне практически отсутствуют (рис. 8А).

В случае длительности импульса 500 мкс (CO_2 -лазерный хирургический аппарат «Ланцет-2») формируется кратер конической формы с отчетливо выраженными термическими изменениями стенок (рис. 8Б).

Во втором разделе экспериментов были исследованы результаты воздействия излучения лазеров с длительностью импульса 20 и 500 мкс на имеющую наибольшее сходство с кожей человека кожу мини-свиней светлогорской популяции [12, 26]. Эксперименты были выполнены в условиях *in vitro*. Сравнение лазеров проводили при сопоставимых режимах.

На рис. 9 (А, Б) представлены результаты воздействия на кожу (вид сверху) серии из 10-ти импульсов импульсно-периодического CO_2 -лазера, при энергии в импульсе 30 мДж, с длительностью 20 мкс, и 10-ти импульсов лазерного хирургического аппарата «Ланцет-2», длительностью 500 мкс и энергией в импульсе 25 мДж.

Из рис. 9А видно, что на поверхности кратера, сформированного излучением с длительностью импульса 20 мкс, нет выраженной зоны периферического воздействия, в отличие от кратера, полученного при воздействии 10-ти импульсов с длительностью 500 мкс (рис. 9Б). При этом отчетливо видно, что длинный (500 мкс) импульс вызывает коагуляцию и карбонизацию ткани, тогда как при использовании короткого (20 мкс) импульса эти эффекты не наблюдаются.

На поперечном сечении обработанных участков кожи (рис. 10А) при длительности импульса 20 мкс отчетливо виден сформированный кратер с ровным дугообразным контуром и уплощенным дном. Форма и размер полученного кратера, по нашему мнению, оптимальны для лазер-

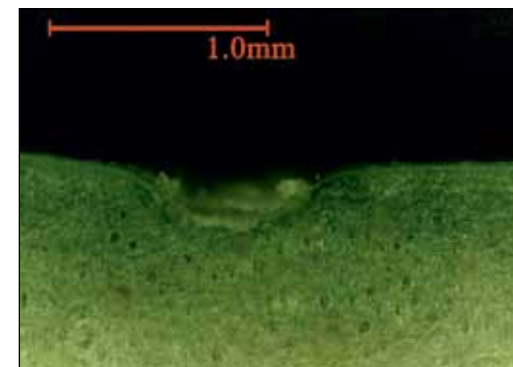


Рис. 8А. Результат воздействия на образец листа Сансевиерия (поперечное сечение области воздействия) 10-ти импульсов импульсно-периодического CO_2 -лазера (энергия 30 мДж, длительность 20 мкс). Ув. 200 X.

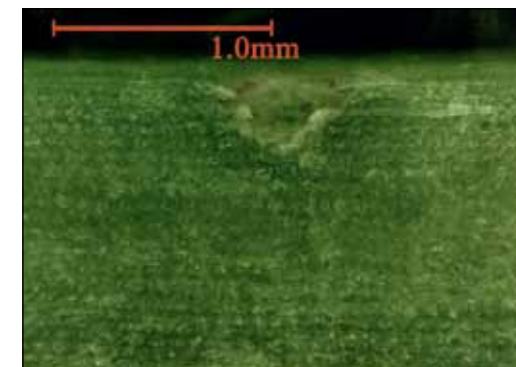


Рис. 8Б. Результат воздействия на образец листа Сансевиерия (поперечное сечение области воздействия) 10-ти импульсов лазера «Ланцет-2» (энергия 25 мДж, длительность 500 мкс). Ув. 200 X.

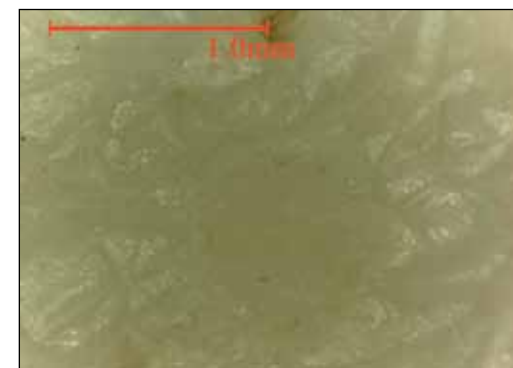


Рис. 9А. Результат воздействия на кожу 10-ти импульсов импульсно-периодического CO_2 -лазера (энергия 30 мДж, длительность 20 мкс). Вид сверху. Ув. 200 X.



Рис. 9Б. Результат воздействия на кожу 10-ти импульсов лазера «Ланцет-2» (энергия 25 мДж, длительность 500 мкс). Вид сверху. Ув. 200 X.

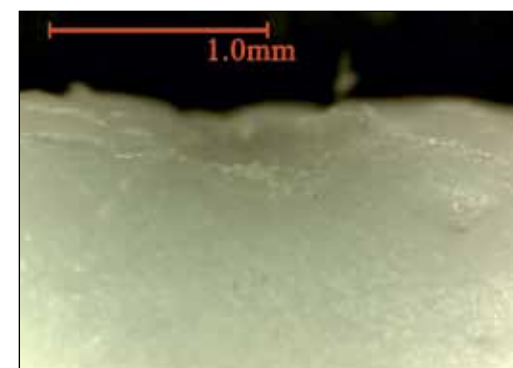


Рис. 10А. Результат воздействия на кожу (поперечное сечение области воздействия) 10-ти импульсов импульсно-периодического CO_2 -лазера (энергия 30 мДж, длительность 20 мкс). Ув. 200 X.

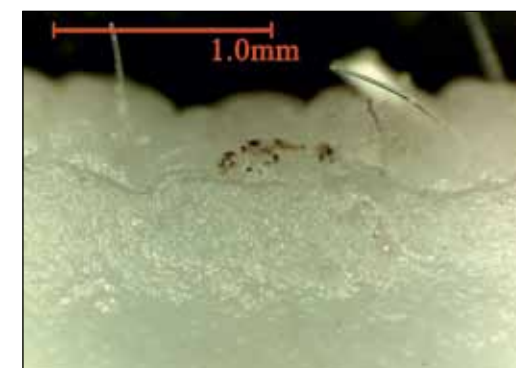


Рис. 10Б. Результат воздействия на кожу (поперечное сечение области воздействия) 10-ти импульсов лазера «Ланцет-2» (энергия 25 мДж, длительность 500 мкс). Ув. 200 X.

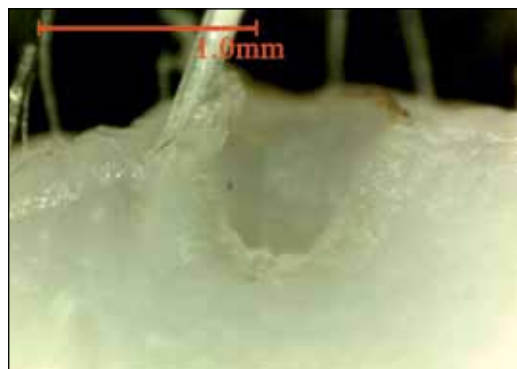


Рис. 11А. Результат воздействия на кожу (поперечное сечение) 50-ти импульсов импульсно-периодического CO₂-лазера (энергия 30 мДж, длительность 20 мкс). Ув. 200 X.

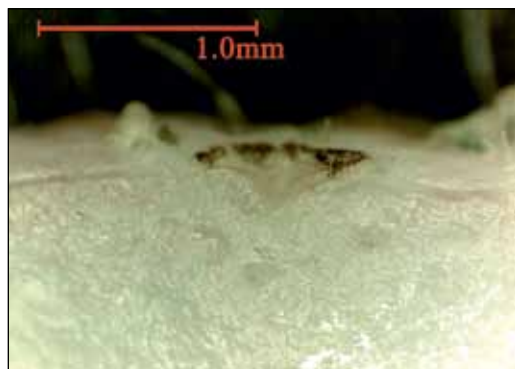


Рис. 11Б. Результат воздействия на кожу (поперечное сечение) 50-ти импульсов лазера «Ланцет-2» (энергия 25 мДж, длительность 500 мкс). Ув. 200 X.

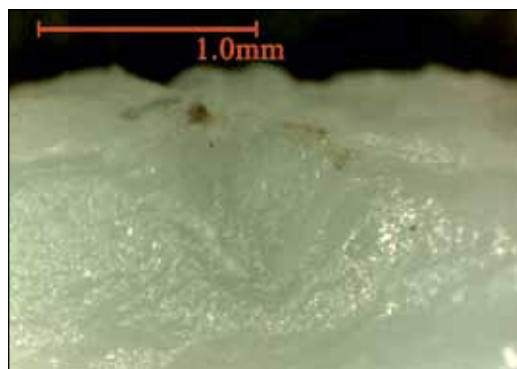


Рис. 12А. Результат воздействия на кожу (поперечное сечение) 50-ти импульсов импульсно-периодического CO₂-лазера (энергия 20 мДж, длительность 20 мкс). Ув. 200 X.



Рис. 12Б. Результат воздействия на кожу (поперечное сечение области воздействия) 50-ти импульсов импульсно-периодического CO₂-лазера (энергия 40 мДж, длительность 20 мкс). Ув. 200 X.



Рис. 13А. Результат воздействия на кожу (поперечное сечение) 50-ти импульсов импульсно-периодического CO₂-лазера (энергия 40 мДж, длительность 20 мкс). Ув. 200 X.

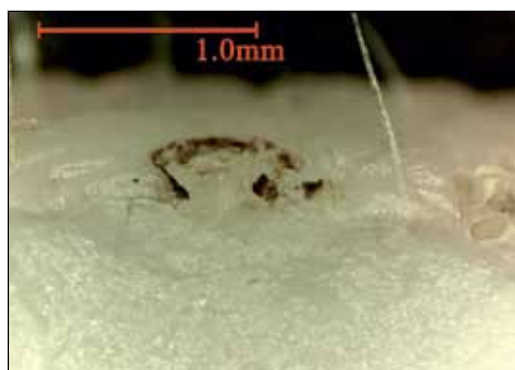


Рис. 13Б. Результат воздействия на кожу (поперечное сечение) 50-ти импульсов лазера «Ланцет-2» (энергия 25 мДж, длительность 500 мкс). Ув. 200 X.

ной послойной шлифовки кожи. Тонкий ободок (0,1 мм) термически измененной ткани отмечается только на поверхности кратера, карбонизация отсутствует. При длительности импульса 500 мкс (лазерный хирургический аппарат «Ланцет-2») кратер отчетливо не визуализируется (рис. 10Б), размер и форма его неопределенные, видны выраженные термические изменения с наличием карбонизированных тканей по краям и на стенках кратера.

Увеличение количества импульсов в серии до 50-ти еще больше подчеркивает различие в результатах воздействия короткого и длинного импульсов излучения. При длительности импульса 20 мкс формируется глубокий кратер цилиндрической формы с плоским дном. По краю среза определяется очень тонкий слой коагулированных тканей (рис. 11А). Воздействие длинного импульса (500 мкс) приводит к образованию кратера конической формы, относительно меньшей глубины, с широким «бортиком» из термически измененных карбонизированных тканей (рис. 11Б).

Важным для оптимизации режима абляции является минимизация термического воздействия на пристеночные ткани лазерного кратера. Возможность термических поражений уточнялась при воздействии на кожу излучения импульсно-периодического CO₂-лазера с длительностью импульса 20 мкс и увеличении энергии в импульсе от 20 до 40 мДж, при 50-ти импульсах (Гц) в одну точку.

На рис. 12 (А, Б) представлены результаты воздействия 50-ти импульсов (Гц) длительностью 20 мкс излучения импульсно-периодического CO₂-лазера, при энергии 20 и 40 мДж. Из рис. 12 (А, Б) следует, что при увеличении импульсной энергии от 20 до 40 мДж образуется кратер, размеры которого увеличиваются

в соответствии с увеличением энергии. Форма его остается цилиндрической с уплощенным дном, а также почти полностью отсутствуют элементы коагуляции и, тем более, карбонизации на его стенках и дне.

На рис. 13 (А, Б) приведено сравнение результатов воздействия 50-ти импульсов излучения импульсно-периодического CO₂-лазера, длительность импульса 20 мкс, энергия в импульсе 40 мДж, с модулированным импульсным излучением непрерывного CO₂-лазера (лазерный хирургический аппарат «Ланцет-2»), длительность импульса 500 мкс, энергия в импульсе 25 мДж.

При увеличении количества импульсов до 50-ти и при одновременном увеличении энергии в импульсе до 40 мДж, в случае длительности импульса 20 мкс, отмечается полное отсутствие термических элементов на стенках и дне кратера, при этом его типичная форма и глубина сохранены, только на поверхности кожи определяются минимальные термические изменения (рис. 13А).

При воздействии излучения с длительностью импульса 500 мкс и меньшей энергией в импульсе 25 мДж при 50-ти импульсах отчетливо визуализируется коагулированная и местами карбонизированная ткань не только на поверхности кратера, но и на его стенках (рис. 13Б).

На основании результатов моделирования абляции биологических тканей были установлены следующие особенности воздействия излучения импульсно-периодического CO₂-лазера:

- в режиме абляции формируется кратер с плавным дугообразным профилем и уплощенным дном, по форме приближенный к цилиндру;
- глубина кратера превышает глубину

поглощения излучения на длине волны 10,6 мкм более чем в 30 раз;

- объем удаленной биоткани в режиме абляции пропорционален энергии лазерного импульса и при энергии 1-го импульса 40 мДж составляет 0,18 мм³;
- зона периферического термического воздействия, минимально возможная при длительности импульса 20 мкс, для СО₂-лазера составляет 0,15-0,25 мм и практически не зависит от параметров лазерного излучения в режиме абляции;
- режим абляции стабильно реализуется при значительном изменении расстояния от точки фокуса до обрабатываемой поверхности;
- воздействие лазерного излучения в режиме сканирования формирует линейный кратер с характеристиками, близкими к результатам при разовых импульсных режимах;
- при длительности импульса СО₂-лазера 500 мкс и энергии импульса 25 мДж при всех режимах воздействия кратер имеет коническую форму и выраженные термические изменения, включая элементы карбонизации с меньшей глубиной, чем при случаях с длительностью импульса 20 мкс.

Таким образом, полученные результаты моделирования абляции биологических тканей хорошо иллюстрируют возможности и преимущества абляции биотканей излучением макетного образца импульсно-периодического СО₂-лазерного аппарата.

Выводы

Излучение импульсно-периодического СО₂-лазера при длительности импульса 20 мкс, энергии импульса 20-40 мДж и размере пятна на поверхности обрабатываемой ткани 0,8 мм реализует оптималь-

ный эффект абляции биоткани, характеризующийся формированием кратера с плавным дугообразным профилем и минимальной зоной периферического термического воздействия без элементов карбонизации.

Макетный образец импульсно-периодического СО₂-лазерного аппарата обеспечивает реализацию оптимального режима абляции модельных биологических тканей (листьев растений и кожи мини-свиней) при всех исследуемых параметрах лазерного воздействия, что демонстрирует надежность конструкции и стабильность параметров его излучения.

Оптимальный режим абляции излучением импульсно-периодического СО₂-лазера в клинической практике позволит осуществлять прецизионное, послойное, прогнозируемое и параллельное поверхности испарение патологических тканей при минимальном термическом повреждении тканевых структур по периферии зоны абляции.

Лазерная дермабразия излучением импульсно-периодического СО₂-лазера станет методом выбора для корректного и эффективного устранения рубцовых деформаций кожных покровов у взрослых больных и детей, что должно значительно улучшить клинические и эстетические результаты их лечения.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 16.522.11.2011 от 27 июня 2012 г. ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007 – 2013 гг».

Список литературы

1. **Алимпиев С.С., Конов В.И., Никифоров С.М.** Масс-спектрометрическое исследование приповерхностного оптического пробоя Крат, сообщения по физике. ФИАН. 1987. С. 17-19.
2. **Алимпиев С.С., Никифоров С.М., Горбатова Н.Е. и др.** Импульсный СО₂-лазер с поперечным разрядом для применения в косметологии // Тезисы докладов X международной научно-технической конференции «Лазеры в науке, технике, медицине». Сочи. 1999. С. 47-50.
3. **Барчуков А.И., Бункин Ф.В., Конов В.И., Прохоров А.М.** Низкопороговый пробой воздуха вблизи мишени излучением СО₂ лазера. Письма в ЖЭТФ. 1974. т. 17. вып. 8. С. 413-416.
4. **Гончарова А., Толстомятов А.М., Фисталь Н.Н.** Косметическая коррекция посттравматических и послеоперационных рубцов методом лазерной дермабразии // Центр лазерной косметологии и пластической хирургии «Lege Artis», Институт неотложной и восстановительной хирургии АМН Украины. Донецк. Украина Травма. 2001. Т.2. № 2. С. 216-218.
5. **Горбатова Н.Е.** Клиническая эффективность применения лазерного излучения при аппендэктомии у детей // Дис. канд. мед. наук. М. 1990. 158 с.
6. **Горбатова Н.Е., Золотов С.А., Никифоров С.М. и др.** Актуальность лазерных хирургических методов в реабилитации детей с посттравматическими и послеожоговыми дефектами кожи // Сборник тезисов докладов Международного конгресса «Реабилитация и санаторно-курортное лечение». М. 2011. С. 40-41.
7. **Горбатова Н.Е., Иванов С.А.** Эстетическая реабилитация у детей, перенесших ожоговую травму // ГУП Центр разработки, выпуска и эксплуатации лазерной медицинской техники АСТР. М. Россия (Лечение ожогов у детей, тезисы конференции комбустиологов СПб.- 2002 год).
8. **Горбатова Н.Е., Катосова Л.К., Лившиц Ю.Л., Ритус А.И., Сидорин А.В.** Сравнительное изучение бактерицидного действия различных видов лазерного излучения на E. coli // Хирургия. 1987. № 8. С. 15-19.
9. **Дольницкий О.В.** Послеожоговые деформации у детей и их хирургическое лечение // Киев. Здоровье. 1971. 139 с.
10. **Доронин В.А.** «Дермабразия СО₂ лазером эпидермально-дермальных дефектов кожи в амбулаторных условиях» // Дис. канд. мед. наук. М. 2004. 116 с.
11. **Еремеев Б.** Лазерная дермабразия. Клиника лазерной медицины. М. К. Калайджян. ООО «Лазертек». М. Copyright © 2001. Cosmetics & Medicine.
12. **Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А.** Светлогорская популяция мини свиней // Биомедицина. 2007. № 6. С. 71-81.
13. **Лазеры в хирургии.** под. Ред. Скобелкин О.К. // М.: Изд-во Медицина. 1989. 256 с.
14. **Лившиц Ю.Л., Горбатова Н.Е., Воробьев С.В., Сидорин А.В.** Оптимальные параметры углекислотного лазерного излучения в профилактике и лечении гнойно-воспалительных хирургических заболеваний у детей // Вестник хирургии имени И.И. Грекова. 1990. № 1. С. 73-75.
15. Патент РФ 2118025 Импульсно-периодический газовый лазер, Никифоров С.М., Алимпиев С.С., Симановский

- Я.О., Горбатова Н.Е., 1998.
16. Патент РФ 2286628 Импульсно-периодический газовый лазер и лазерная хирургическая установка, Никифоров С.М., Алимпиев С.С., Симановский Я.О., Горбатова Н.Е., 2005.
17. Прикладная лазерная медицина. под ред. Х.-П. Берлиен, Г. Й. Мюллер. // Учебное и справочное пособие: Перевод с немецкого – М: АО Интерэксперт». 1997. 356 с. С. 91-98, 327-328.
18. Применение лазеров в гинекологии. под ред. Побединский Н.М. // Практическое руководство. Сочинский науч.-мед. центр «Интемед». Состав: Зуев В.М., Бронештер Д.С. и др. Сочи. 1991. 61 с.
19. *Рошаль Л.М., Гайдышев Э.А., Горбатова Н.Е. и др.* Применение излучения углекислотного лазера в хирургии детского возраста // Хирургия. М. 1987. № 8 С. 12-15.
20. *Самохин А.А.* Фазовые переходы первого рода при действии лазерного излучения на поглощающие конденсированные среды // Действие лазерного излучения на поглощающие конденсированные среды (Труды ИО-ФАН, т.13). М.: Наука.1990.С.1-98.
21. *Скобелкин О.К., Козлов В.И., Гейниц А.В. и др.* Применение лазерных хирургических аппаратов «Ланцет» в медицинской практике: пособие для врачей. Тула: Гриф и К. 2002.- 92 с.
22. *Скобелкин О.К., Козлов В.И., Гейниц А.В. и др.* «Применение лазерных хирургических аппаратов «ЛАНЦЕТ» в медицинской практике», // Пособие для врачей. М. 2000. 94 с.
23. *Смирнов Д.В.* Лазерная дермабразия в комплексном лечении послеожоговых рубцов эстетически важных зон кожного покрова у детей // Дис. канд. мед. Наук. М. 2003.128 с.
24. *Чирешкин Д.Г., Дунаевская А.М., Тимен Г.Э.* Лазерная эндоскопическая хирургия верхних дыхательных путей // М.: Изд-во Медицина. 1990. 192 с.
25. *Шапиро К.И.* Травматизм опорно-двигательного аппарата подростков // Травматология и ортопедия России. 1995. №2. 37 с.
26. *Швецова Е.В., Роговая О.С., Киселев И.В., Потеекаев Н.Н., Васильев А.В., Ткаченко С.Б.* Модели для исследования кожи. Свиная кожа как адекватная модель исследования восстановительных процессов в коже человека // Клиническая дерматология и венерология. 2006. № 4. С. 47-50.
27. *Achauer Bruce M., et al.* «Lasers in plastic surgery and dermatology» Bruce M. Achauer, Victoria M. Vander Kam, Michael W. Berns. New York: Thieme med. publ.; Stuttgart; New York: Thieme. 1992.
28. *Alster T.S.* Washington Institute of Dermatologie Laser Surgery, Washington, DC 20037. USA. «Clinical and histologic evaluation of six erbium:YAG. lasers for cutaneous resurfacing» Lasers Surg Med 1999;24(2):87-92
29. *Alster Tina S., MD and Jason R. Lupton,* MD Review: «Laser Scar Revision peer reviewed» The Journal: Volume 2. Issue 1. March. 2000. ISSN: 1529-1545.
30. *Alster Tina S., MD Ivy J Groover MD* «Laser Revision of Scars» Last Updated: June 25. 2001. © Copyright 2002, eMedicine.com, Inc.
31. *Alster T.* Washington Institute of Dermatologie Laser Surgery, Washington, DC. «Laser Scar Revision: Comparison Study of 585-nm Pulsed Dye Laser with and Without Intralesional

Corticosteroids» Dermatol Surg. 2003 Jan; 29(1):25-9.

32. *Vogel A., Venugopalan V.* Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues // Chem. Rev. 2003. V. 103 (2). P. 577-644.

Ablation of biological tissue by CO₂-laser pulses with different duration

N.E. Gorbatova, S.A. Zolotov, Ya.O. Simanovskiy, S.M. Nikiforov,
S.V. Golubev, S.S. Alimpiev, A.V. Geinitz, N.V. Stankova

Comparison of the efficiency of the laser ablation of biological tissue with the use of a repetitively pulsed CO₂-laser with transverse discharge and a continuous CO₂-laser with modulated output radiation is carried out. It is shown that the ablation efficiency is higher for the repetitively pulsed laser with a pulse duration of 20 μs and a pulse power of more than 2 kW, and the radiation from the cw laser with the power of 50 W and pulse duration of 500 μs results in much greater thermal damage to the tissue surrounding the impact zone.

The first clinical application of the repetitively pulsed CO₂-laser in dermatology and plastic reconstructive and restorative surgery has shown its clinical and aesthetic performance and identified key long-term direction of its further use for surgery.

Key words: CO₂-laser, laser ablation, biological tissue.

Влияние фосфорорганических соединений на факторы врожденного иммунитета мышей

Т.С. Запорожец¹, Л.А. Иванушко¹, А.К. Гажа¹, Е.В. Михеев², Н.Н. Ковалев²

¹ – Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Сибирского отделения РАМН

² – Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр, Владивосток

Контактная информация: д.м.н. Запорожец Татьяна Станиславовна, niiem_yl@mail.ru

Проведено исследование влияния фосфорорганического соединения О-этил-S-гексилметилтиофосфаната (ФОС) на активность сывороточной холинэстеразы и факторы врожденного иммунитета неинбредных мышей. Установлено, что О-этил-S-гексилметилтиофосфанат (LD_{50} для неинбредных мышей при внутрибрюшинном введении $12,33 \pm 4,05$ мг/кг) ингибирует активность сывороточной холинэстеразы, достигая максимума к 24 ч после введения. Фосфорорганическое соединение обладает выраженным иммунотоксическим действием в отношении факторов врожденного иммунитета экспериментальных животных, вызывая лейкопению, обусловленную уменьшением относительного содержания нейтрофильных лейкоцитов, угнетение функциональной активности нейтрофилов и макрофагов (снижение адгезивной и бактерицидной активности).

Ключевые слова: фосфорорганические соединения, холинэстераза, врожденный иммунитет.

Введение

Вопросы, связанные с изучением холинэстеразы и антихолинэстеразных веществ, в течение многих лет находятся в центре внимания специалистов различного профиля [1]. Токсикология антихолинэстеразных средств имеет большое значение, поскольку препараты этого механизма действия довольно часто используются в быту в качестве инсектицидов [8] или в сельском хозяйстве в качестве пестицидов [2]. Эти вещества чаще всего относятся к группе фосфорорганических соединений (ФОС) [6]. Обладающие выраженной физиологической активностью, ФОС нашли применение и в медицинской практике [5]. Общеизвестно, что ведущим звеном в механизме действия этих веществ на организм человека и теплокровных животных является нарушение каталитической функции фер-

мента холинэстеразы во всех органах и структурах, имеющих холинергическую иннервацию, и, прежде всего, в нервной системе [1]. Однако влияние таких соединений на организм не ограничивается ингибированием холинергических процессов. В ряде публикаций представлены доказательства роли иммунной системы в патогенезе нейротоксического действия, наблюдаемого при воздействии ФОС на организм [4, 9].

Целью настоящей работы явилась оценка влияния фосфорорганического соединения на холинергическую и иммунную системы экспериментальных животных *in vivo*.

Материалы и методы

В качестве ФОС использовали синтетический О-этил-S-гексилметилтиофосфанат (шифр ЛГ-63), который среди О-этил-S-

гексилметилтиофосфанатов с нормальным алкильным радикалом является активным антихолинэстеразным соединением.

Экспериментальные исследования выполнены на неинбредных белых конвенциональных мышах-самцах (возраст 2-3 мес.) массой 18-20 г, полученных из питомника «Рассвет», НПО «Вирион», г. Томск. Все исследования проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» [7], международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах, и стандартными операционными процедурами лаборатории.

Мышей содержали в комнатах барьерного типа с контролируемыми условиями окружающей среды в пластиковых клетках (по 2 животных в клетке площадью 400 см^2) на подстиле из резаной пищевой бумаги. Животные получали стандартный пищевой рацион и профильтрованную водопроводную воду.

Острую токсичность (LD_{50}) ФОС определяли, вводя мышам (по 8 особей в группе) внутрибрюшинно О-этил-S-гексилметилтиофосфанат в дозах 100 мкг/мышь (5 мг/кг), 500 мкг/мышь (25 мг/кг) и 1000 мкг/мышь (50 мг/кг) в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл. LD_{50} рассчитывали с помощью метода пробит-анализа. Для оценки влияния соединения на остаточную активность холинэстеразы в сыворотке крови, клеточность лимфоидных органов и факторы врожденного иммунитета мышам (по 6 особей в группе) вводили ФОС внутрибрюшинно в сублетальной дозе 100 мкг/мышь (5 мг/кг) в 0,5 мл физиологического раствора. Контрольной группе животных вводили физиологический раствор в том же объеме, что и исследуе-

мый препарат. Через 2, 4, 16, 24, 48, 72 ч мышей выводили из опыта декапитацией под эфирным наркозом и определяли остаточную активность холинэстеразы в сыворотке крови спектрофотометрическим методом Элмана [11] с использованием в качестве субстрата иодида ацетилтиохолина (ICN, США). Абсолютное количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, общую клеточность лимфоидных органов (количество ядросодержащих клеток (ЯСК)), клеточный состав экссудата перитонеальной полости подсчитывали стандартными методами [3]. Фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов перитонеальной полости мышей регистрировали по поглощению *S. aureus* (штамм 209). Для этого взвесив клетки в объеме 100 мкл соединяли в центрифужных пробирках со 100 мкл взвеси *S. aureus* в соотношении 1:20, инкубировали 30 мин при 37°C , центрифугировали при 200 g 5 мин, надосадочную жидкость сливали, из осадка готовили мазки, фиксировали метанолом, окрашивали азур-II-эозином и микроскопировали, определяя фагоцитарный показатель (ФП%) – процент клеток, участвующих в фагоцитозе, и фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число микроорганизмов, поглощенных одним фагоцитом. Адгезивные свойства и бактерицидную активность (НСТ-тест) клеток перитонеальной полости мышей исследовали спектрофотометрическим методом [10].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Statistica 6». Использовались следующие методы статистического анализа: проверка нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием W-критерия Шапиро-Уилка, оценка значимости различий при нормальном

распределении количественных признаков — t-критерий Стьюдента (для независимых выборок), при ненормальном распределении – непараметрический критерий Манна-Уитни (для сравнения двух попарно не связанных между собой вариационных рядов). Для множественных сравнений использовали дисперсионный ранговый метод ANOVA (Kruskal-Wallis) & Median test. Выборочные параметры, приводимые далее в таблицах, имеют следующие обозначения: средняя арифметическая (M), стандартное отклонение (σ), значения медианы и интерквартильного размаха Me (LQ-UQ), объем анализируемой подгруппы (n). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

Результаты и их обсуждение

При изучении острой токсичности О-этил-S-гексилметилтиофосфата проводили наблюдение за животными, оценивали сроки гибели, число павших животных, клиническую картину интоксикации, поведенческие реакции. LD_{50} ФОС для белых неинбредных мышей при внутрибрюшинном введении составила $12,33 \pm 4,05$ мг/кг (рис. 1).

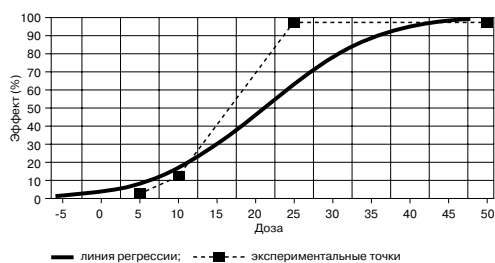


Рис. 1. Пробит-анализ. Вероятность наступления смерти (по оси ординат, в %) в зависимости от дозы О-этил-S-гексилметилтиофосфата (по оси абсцисс, в мг/кг).

При исследовании антиферментной активности О-этил-S-гексилметилтиофосфата изучали его взаимодей-

ствие с ацетилхолинэстеразой сыворотки крови мышей. Токсический эффект при введении 5 мг/кг соединения развивался в течение 24 ч, когда остаточная активность холинэстеразы сыворотки крови животных снижалась максимально (рис. 2). Восстановление исходного уровня активности фермента наблюдалось через 48 ч после введения ФОС.

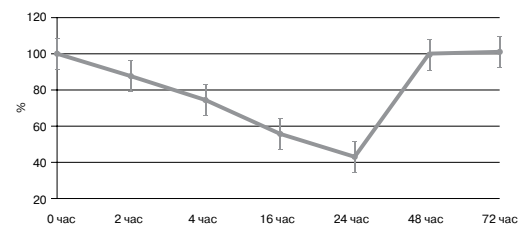


Рис. 2. Остаточная активность сывороточной холинэстеразы плазмы крови мышей после введения сублетальной дозы ФОС (в % к контролю, принятому за 100%).

Через 2 ч после внутрибрюшинного введения мышам ФОС в дозе 5 мг/кг наблюдался транзиторный лейкоцитоз, сменяющийся через 4 ч лейкопенией, обусловленной уменьшением относительного содержания нейтрофильных лейкоцитов. Масса и клеточность селезенки в течение 4 ч не изменялись (ANOVA (Kruskal-Wallis: $p=0,306$) (табл. 1). В экссудате перитонеальной полости $46,2 \pm 8,2\%$ нейтрофилов и $37,5 \pm 4,5\%$ макрофагов были полностью разрушены. Фагоцитарная активность неповрежденных клеток была значительно снижена по сравнению с контролем (интактные мыши) (табл. 2).

Через 4 ч количество нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе, несколько увеличивалось, что объясняется миграцией неповрежденных клеток из кровеносного русла (табл. 2), однако способность к поглощению оставалась сниженной и у этих клеток. Фагоцитарная активность

Таблица 1

Влияние ФОС на клеточный состав периферической крови, клеточность и массу селезенки неинбредных мышей

Показатели	Группа	Shapiro-Wilk, W	$M \pm \sigma$ (Me) (LQ-UQ)	Mann-Whitney, T-test P	ANOVA (Kruskal-Wallis) p
Лейкоциты (109/л)	Контроль	0,88	6,90±0,81		0
	ФОС	2 часа	9,40±2,45	0,041	
		4 часа	4,50±1,04	0,002	
Моноциты (%)	Контроль	0,90	10,2±1,6		0,099
	ФОС	2 часа	8,2±1,2	0,033	
		4 часа	8,8±1,5	0,144	
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	Контроль	0,85	7,41±1,93		0
	ФОС	2 часа	4,28±1,32	0,008	
		4 часа	18,1±3,1 17,00 (16,00;24,00)	0	
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	Контроль	0,68	0,5±0,55 0,5 (0,00; 1,00)		0,007
	ФОС	2 часа	1,5±0,54 1,5 (1,00;2,00)	0,01	
		4 часа	2,0±0,63	0,001	
Лимфоциты (%)	Контроль	0,98	81,0 ±4,9		0,004
	ФОС	2 часа	85,3±5,6	0,187	
		4 часа	71±4,9	0,005	
Клеточность селезенки (ЯСКx106)	Контроль	0,94	301,6±56,3		0,306
	ФОС	2 часа	322,6±67,3 357,00 (226,00; 378,00)	1	
		4 часа	339,5±67,3	0,273	
Масса селезенки (мг)	Контроль	0,84	222,6±51,9		0,306
	ФОС	2 часа	221,2±40,6	0,544	
		4 часа	197,8±81,5 195,00 (100,00; 338,00)	1	

Примечание: для всех значений критерия W - $p > 0,05$ (параметры имеют нормальное распределение).

макрофагов перитонеальной полости мышей, инъецированных ФОС, продолжала снижаться, поскольку миграция этой популяции клеток в ответ на раздражитель наблюдалась позже – через 24 ч, а функциональная активность присутствующих в брюшной полости макрофагов ингибировалась под действием ФОС.

При исследовании влияния ФОС на функциональную активность клеток перитонеальной полости установлено снижение способности фагоцитов к адгезии

на пластик и продукции активных форм кислорода (табл. 2).

Выводы

Таким образом, полученные результаты указывают, что фосфоорганическое соединение – этил-S-гексилметилтиофосфанат – при внутрибрюшинном введении неинбредным мышам в дозе 5 мг/кг приводит к угнетению активности сывороточной холинэстеразы и обладает выраженным иммунотоксическим

Таблица 2

Влияние ФОС на функциональную активность клеток перитонеальной полости неинбредных мышей

Показатели		Группа	Shapiro-Wilk, W	M±σ (Me) (LQ-UQ)	Mann-Whitney, T-test p	ANOVA (Kruskal-Wallis) p	
Макрофаги	ФП (%)	Контроль	0,82	76,3±6,6		0	
		ФОС	2 часа	0,92	55,3±6,2		0
			4 часа	0,98	32,2±3,8		0
	ФЧ	Контроль	0,88	15,0±2,7		0	
		ФОС	2 часа	0,98	7,3±2,2		0
			4 часа	0,84	1,4±0,2		0
Нейтрофилы	ФП (%)	Контроль	0,97	42,3±6,7		0,006	
		ФОС	2 часа	0,85	28,3±3,2		0,002
			4 часа	0,95	33,7±4,9		0,004
	ФЧ	Контроль	0,90	2,7±1,2		0,024	
		ФОС	2 часа	0,82	1,0±0,6		0,014
			4 часа	0,63	1,3±0,5 1,0 (1,00; 2,00)		0,033
КПП	Адгезия (тыс. кл)	Контроль	0,92	363,6±26,6		0,004	
		ФОС	2 часа	0,98	308,8±30,3		0,008
			4 часа	0,96	277,0±28,7		0
	НСТ (ОД x 10 ⁻³)	Контроль	0,88	13,2±3,4		0	
		ФОС	2 часа	0,98	6,4±1,6		0
			4 часа	0,84	4,5±1,0		0

Примечание: для всех значений критерия W - p>0,05 (параметры имеют нормальное распределение).

действием в отношении факторов врожденного иммунитета экспериментальных животных, вызывая лейкопению и угнетение функциональной активности нейтрофилов и макрофагов (снижение адгезивной, фагоцитарной и бактерицидной активности).

Список литературы

1. Голиков С.Н., Розенгарт В.И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. Л.: Медицина. 1964. 382 с.
2. Каган Ю.С. Глобальное значение пестицидов и особенности их биологического действия // Профилактическая токсикология / Под. ред. Н.Ф. Измерова. М: Центр международных проектов. 1984. 2. Ч.1. С. 123-134.
3. Лабораторные методы исследования в клинике (справочник под ред. В.В. Меньшикова). М., «Медицина». 1987. 365 с.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М. «Медицина». 2000.

5. О'Брайн Р.Д. Токсические эфиры кислот фосфора. М.: Мир. 1964. 278 с.
6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации».
7. Розенгарт В.И., Шерстобитов О.Е. Избирательная токсичность фосфорорганических инсектоакарицидов. Л.: Наука. 1978. 174 с.
8. Сидоренко Г.И., Федосеева В.Н., Щарецкий А.Н., Пристовская Л.В. Иммунотоксикология важнейшее направление исследований в гигиене окружающей среды // Гигиена и сан. 1989. № 3. С. 7-11.
9. Хаитов, Р.М. Экологическая иммунология / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, Х.И. Истамов. М. 1995. 219 с.
10. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochem. Pharmacol. 1961. Vol. 7. № 1. P. 88-95.

Assessing the impact of organophosphorus compounds on the factors of innate immunity of mice

T.S. Zaporozhets, L.A. Ivanushko, A.K. Gazha, E.V. Miheev, N.N. Kovalev

The action of organophosphorus compounds (OPC) O-ethyl-S-geksilmetiltiofosfanata on the activity of serum cholinesterase and factors of nonspecific resistance purebred mice has been studied. LD₅₀ of O-ethyl-S-geksilmetiltiofosfanata for neinbrednyh mice after intraperitoneal injection of 12,33 ± 4,05 mg / kg. Inhibition of serum cholinesterase remains within 24 h after injection. Organophosphorus compound has a pronounced immunotoxic effect on the factors of innate immunity, causing leukopenia, inhibition of functional activity of neutrophils and macrophages (decrease adhesive, phagocytic and bactericidal activity).

Key words: organophosphorus compounds, cholinesterase, innate immunity.

Гендерные и циркадианные различия в эффектах диазепама у адrenaлэктомированных и стрессированных крыс при многопараметрическом тестировании

Э.А. Манвелян, В.А. Батурич, Н.А. Анисимова

ГОУ ВПО «Ставропольская государственная медицинская академия»

Минздравсоцразвития РФ, Ставрополь

ГБАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь

Контактная информация: д.ф.н. Манвелян Элеонора Аслибековна, manveljan@rambler.ru

В экспериментах на белых крысах линии Wistar оценивали влияние стресса на эффекты диазепама (0,1 и 0,5 мг/кг) у интактных и адrenaлэктомированных самцов и самок крыс при многопараметрическом тестировании в 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 3 ч.

Выявлено, что стрессирование интактных самцов заметно ослабляет седативный эффект диазепама, смещая на ранние утренние часы, а у самок, напротив, усиливает, индуцируя, и в вечернее время. Кроме того, стресс нивелирует активирующее действие препарата у самок и анксиогенное влияние у самцов и самок крыс. Также стрессирование существенно ослабляет противотревожную активность диазепама у интактных самцов, а у самок смещает с вечерних часов на утренние.

Показано, что адrenaлэктомия ослабляет седативное и противотревожное, нивелирует анксиогенное действие диазепама у самцов. У самок удаление надпочечника нивелирует седативный и активирующий эффекты, смещает на ранние вечерние часы противотревожную активность, а также индуцирует анксиогенное действие транквилизатора в дозе 0,1 мг/кг и нивелирует в дозе 0,5 мг/кг.

Установлено, что стресс на фоне адrenaлэктомии у самцов нивелирует седативный эффект малой и индуцирует большей дозы диазепама, существенно ослабляет противотревожное и индуцирует анксиогенное действие препарата. Стрессирование адrenaлэктомированных самок усиливает седативное и противотревожное действие, нивелирует анксиогенный эффект транквилизатора.

Ключевые слова: диазепам, стресс, адrenaлэктомия.

Введение

Востребованность результатов исследований по проблеме стресса определяется патогенетическим характером воздействия стрессорных факторов и возможностью оценить физиологические механизмы изменений [17]. Вовлеченность надпочечников в развитие стресс-реакции; возникновение в ответ на стрессорные воздействия тревожных расстройств и рост числа психических нарушений; широкое использование транквилизаторов, прежде всего, бензодиазепинового ряда

при фармакотерапии невротоподобных состояний и психических заболеваний делают актуальными изучение влияния стресса на эффективность анксиолитиков и исследование участия надпочечников в реализации специфической активности этой группы препаратов [1, 2, 4, 5, 12, 13]. Изменение эффективности противотревожных лекарственных средств под влиянием стресса, нарушения функции надпочечников с учетом пола, времени суток недостаточно изучено в клинических и экспериментальных условиях. Ра-

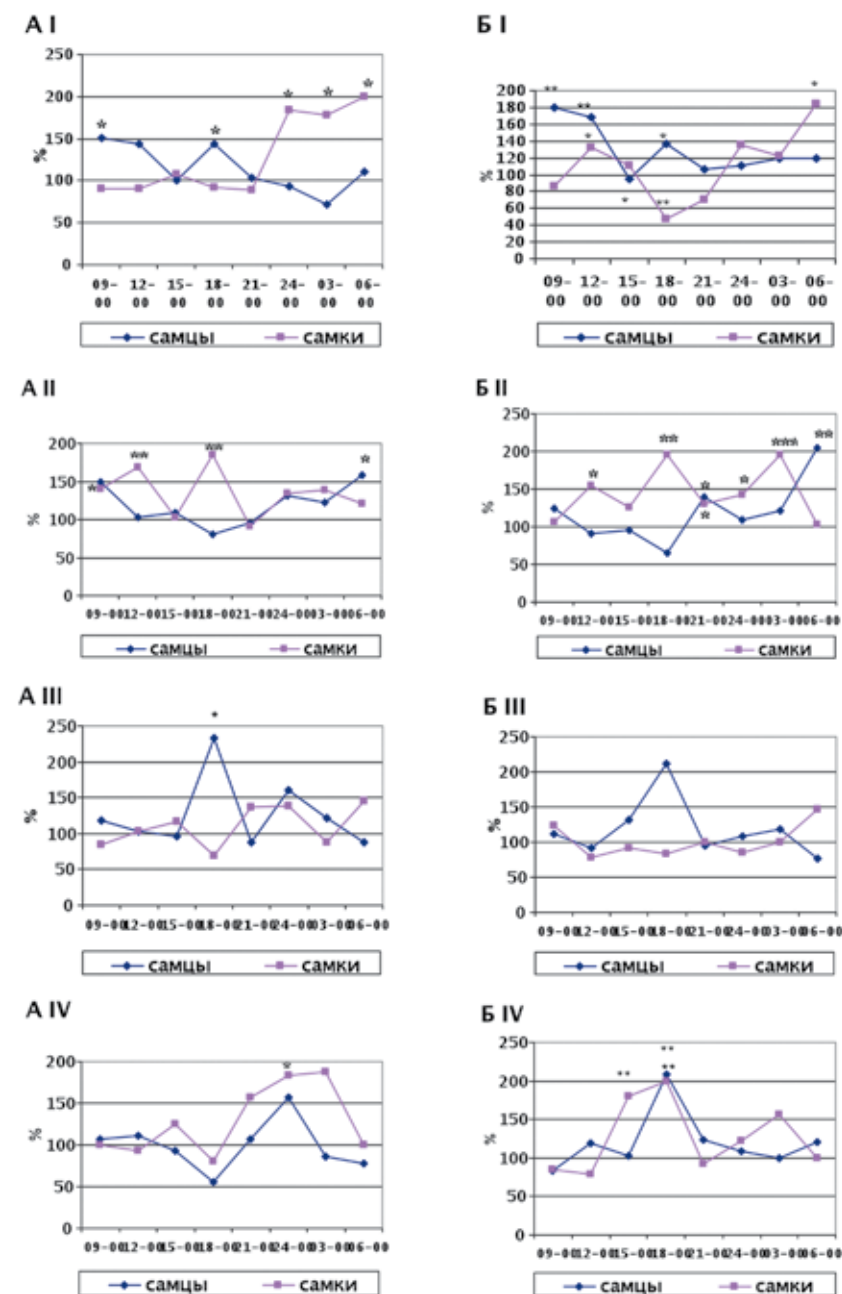


Рис. 1. Влияние диазепама на индекс двигательной активности интактных без (I) и после стресса (II), адrenaлэктомированных без (III) и после стресса (IV) самцов и самок крыс при многопараметрическом тестировании на протяжении суточного цикла. А – диазепам 0,1 мг/кг; Б – диазепам 0,5 мг/кг. По оси абсцисс – время тестирования. По оси ординат (в %): значения индекса двигательной активности. 100% – индекс двигательной активности соответственно контрольных интактных и адrenaлэктомированных без и после стресса самцов и самок, получавших физиологический раствор. * – при P < 0,05; ** – при P < 0,01; *** – при P < 0,01.

нее установлены половые и циркадианные различия стрессового влияния на эффекты диазепама у интактных крыс [9]. Показано, что стресс ограничивает антиконфликтный эффект и подвергает инверсии антиагрессивное действие транквилизаторов [14, 15]. В этой связи, **целью** исследования было изучение влияния стресса на противотревожное и седативное действие эталонного анксиолитика диазепама у интактных и адреналэктомированных (АЭ) самцов и самок крыс при многопараметрическом тестировании на протяжении суточного цикла.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на белых половозрелых интактных и адреналэктомированных самцах и самках крыс линии Wistar (питомник Рапполово) средней массой 200-220 г (по 6-10 крыс в группе). Животных содержали в клетках-ваннах (по 5-6 крыс) при естественном освещении и максимальной стандартизации температурного режима. Кормление (комбикорм) и уход осуществляли в привычном для животных режиме вивария. Обеспечивался свободный доступ крыс к пище и воде.

Для комплексной оценки тревожно-фобического статуса у крыс использовали многопараметрическую методику [18]. С этой целью каждой крысе в специальной камере предъявляли в определенной последовательности 9 тестов: определение латентных периодов: 1 – спуска с высоты, 2 – прохождения через отверстие, 3 – выхода из темного «домика», 4 – выхода из центра «открытого поля»; реакцию на смену освещенности: 5 – пачение-1; а также реакции на руку экспериментатора: 6 – пачение-2, 7 – затаивание, 8 – вокализация, 9 – прижимание ушей. Ответ на каждый тест оценивали от 0 до

3 баллов: большая оценка в баллах соответствовала более выраженной ответной реакции у животного. Данные тестирования представляли графически. По изменению суммарного показателя по тестам 1–4 (индекс двигательной активности – ИДА) судили о седативном (повышение показателя, снижение двигательной активности) или активирующем (снижение ИДА, повышение двигательной активности) эффекте, а по изменению суммарного показателя по тестам 5–9 (индекс эмоциональной реактивности – ИЭР) – о противотревожном (снижение ИЭР и снижение эмоциональной реактивности) или анксиогенном (повышение ИЭР и повышение эмоциональной реактивности) эффекте транквилизатора. Стрессирование животных проводили путем подвешивания крысы за дорсальную кожную складку в течение одного часа за 3 ч до начала тестирования. Надпочечник удаляли согласно общепринятой методике [7]. Все запланированные эксперименты на адреналэктомированных и ложнопериоперированных животных начинали спустя неделю после операции. Диазепам в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг и физиологический раствор вводили за 30 мин до эксперимента. Опыты проводили в 9, 12, 15, 18, 21, 24, 3 и 6 ч.

Во время работы с животными соблюдались принципы Хельсинкской Декларации о гуманном обращении с объектами исследования.

Полученные результаты обрабатывались статистически с использованием пакета компьютерных программ. Проводили относительный сравнительный анализ, в т.ч. вычисляя среднесуточное среднеарифметическое значение индексов двигательной активности и эмоциональной реактивности. Сопоставляли данные о влиянии диазепама (100% – физиоло-

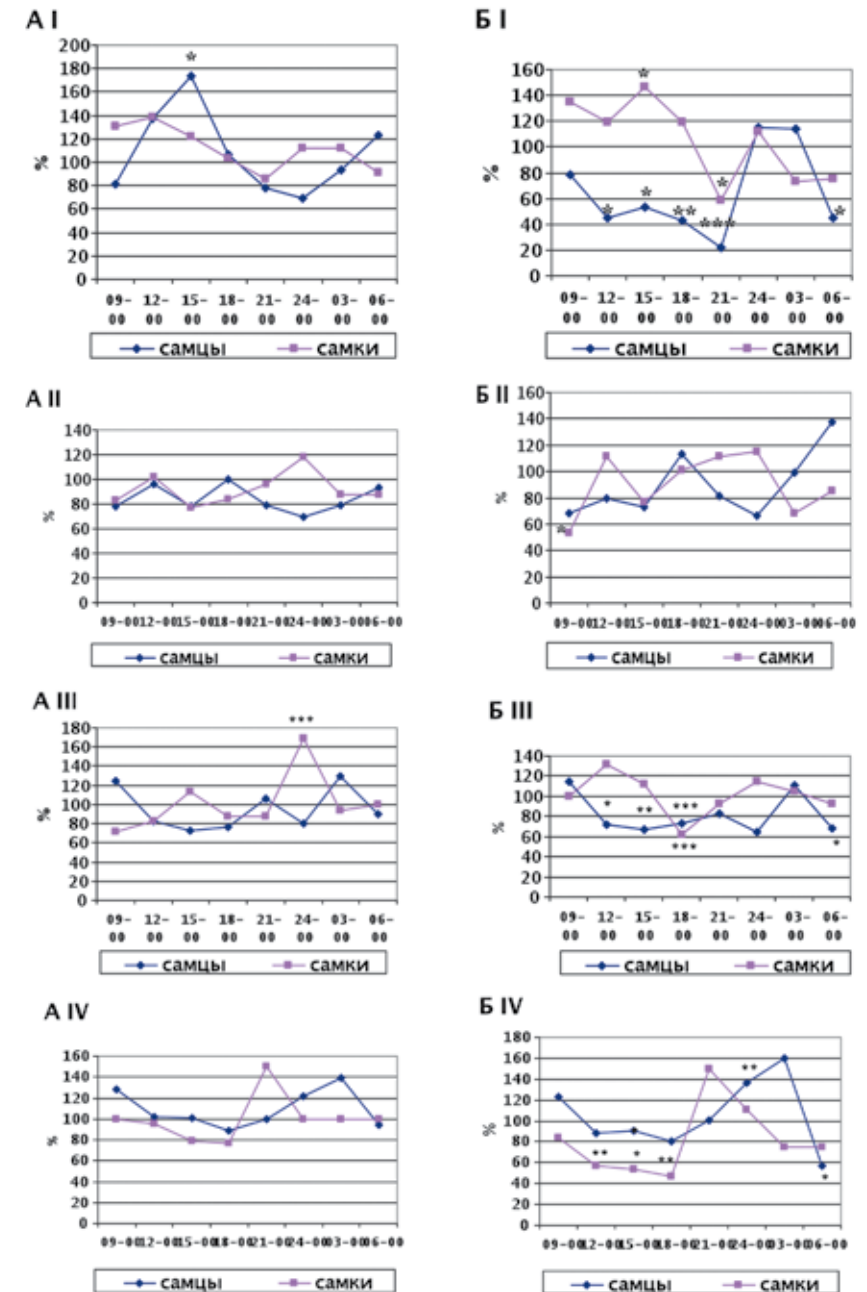


Рис. 2. Влияние диазепама на индекс эмоциональной реактивности интактных без (I) и после стресса (II), адреналэктомированных без (III) и после стресса (IV) самцов и самок крыс при многопараметрическом тестировании на протяжении суточного цикла. По оси ординат (%): значения индекса эмоциональной реактивности. 100% – индекс эмоциональной реактивности интактных и адреналэктомированных соответственно без и после стресса самцов и самок, получавших физиологический раствор. (Остальные обозначения см. на рис. 1).

гический раствор) у интактных, ложнопериорированных и адреналэктомированных самцов и самок без и после стресса. Выявление статистически значимых отличий проводили с помощью критериев Стьюдента, Вилкоксона-Манна-Уитни [16].

Результаты исследований

В ходе наблюдений были выявлены циркадианные различия в эффективности диазепама у самок и самцов крыс.

1. Тестирование интактных животных без стресса.

Средний ИДА при введении транквилизатора в дозе 0,1 мг/кг у самцов был несколько выше, нежели у контрольных

крыс, получавших физиологический раствор. Отличия наиболее заметны были в 9 и 18 ч ($p < 0,05$). У самок на фоне препарата также отмечали сравнительно большой средний ИДА. При этом повышение показателя регистрировали в 24, 3 и 6 ($p < 0,05$) ч. Следовательно, седативный эффект диазепама в дозе 0,1 мг/кг у самцов проявлялся утром и вечером, а у самок – ночью и рано утром (рис. 1А I).

Средний ИЭР у самцов при использовании транквилизатора в малой дозе несущественно повышался. При этом показатель был высок в 15 ч ($p < 0,05$) и имел тенденцию к снижению вечером. У самок препарат также вызывал некоторое повышение среднего индекса эмоци-

ональности. Тем самым установлено, что у самцов днем наблюдалась анксиогенная активность препарата (рис. 2А I).

При введении диазепама в большей дозе (0,5 мг/кг) средний ИДА у самцов достоверно повышался и был заметно высок в 9 ($p < 0,01$), 12 ($p < 0,01$) и 18 ($p < 0,05$) ч по сравнению с контрольными крысами, получавшими физиологический раствор. При аналогичном тестировании самок не отмечали существенного изменения среднего показателя моторной активности, однако выявили повышение его в 6 и 12 ($p < 0,05$) и заметное снижение в 18 ч ($p < 0,01$). Таким образом, у самцов преимущественно проявлялся седативный эффект большей дозы диазепама, а

у самок седативный утром и днем и активирующий вечером (рис. 1Б I).

На фоне введения диазепама в дозе 0,5 мг/кг у самцов средний ИЭР заметно уменьшался ($p < 0,05$). Снижение показателя в течение суток было выявлено в 6, 12, 15, 18 ч, с минимумом в 21 ч ($p < 0,05$). У самок средний индекс эмоциональности не изменялся, однако на протяжении суточного цикла имел тенденцию к повышению в утренние и дневные часы (достоверно в 15 ч) и снижался к 21 ч ($p < 0,05$) (рис. 2Б I). Следовательно, у самцов отмечалось противотревожное действие диазепама в дозе 0,5 мг/кг утром, днем и вечером, а у самок – анксиогенная активность днем и противотревожная – вечером.

Таблица 1

Индекс двигательной активности интактных (И.) и адреналэктомированных (АЭ) самцов и самок крыс без и после стресса при многопараметрическом тестировании на протяжении суточного цикла

Диазепам	9	12	15	18	21	24	3	6	Итого
И. физ. р-р самцы n=79	3,9+ 0,64	3,9+ 0,59	4,2+ 0,51	4,3+ 0,42	5,1+ 0,57	5,5+ 0,43	5,67+ 0,69	5,0+0,45	4,7+ 0,25
И. физ. р-р самки n=78	5,67+ 0,6	5,9+ 0,6	5,6+ 0,69	6,67+ 0,56	5,0+ 0,89	3,1+ 0,64	3,2+ 0,66	2,9+0,78	4,76+ 0,52
И. стресс физ. р-р самцы n=69	4,67+ 0,61	5,13+ 0,72	5,57+ 0,61	6,4+ 0,82 #	5,9+ 0,59	5,0+ 0,5	5,22+ 0,43	4,0+0,91 #	5,24+ 0,26
И. стресс физ. р-р самки n=76	6,0+ 0,62	4,64+ 0,59	6,46+ 0,81	3,89+ 0,63 #	6,4+ 0,45	5,88+ 0,9 #	4,5+ 0,5	6,17+0,95 #	5,49+ 0,35
АЭ физ. р-р самцы n=60	5,6+ 0,83	5,7+ 0,94	5,0+ 0,57	2,0+ 0,67	7,0+ 0,84	3,8+ 1,24	4,8+ 1,5	4,8+2,03	4,84+ 0,52
АЭ физ. р-р самки n=40	3,25+ 0,25	6,6+ 1,12	5,6+ 1,17	6,0+ 0,77	6,0+ 1,22	4,2+ 1,2	5,4+ 1,12	3,67+0,49	5,09+ 0,43
АЭ стресс, физ. р-р самцы n=60	6,2+ 0,71	5,3+ 0,79	5,1+ 0,6	2,8+ 0,61	5,4+ 0,6	3,6+ 1,12	6,6+ 1,12	5,4+1,12	5,05+ 0,45
АЭ стресс, физ. р-р самки n=79	3,25+ 0,25	5,6+ 0,98	4,0+ 0,84	3,75+ 0,75	3,5+ 0,29	3,6+ 0,6	3,2+ 0,73	3,75+0,75	3,83+ 0,27 #

Достоверные отличия между стрессированными и не стрессированными контрольными соответственно интактными и адреналэктомированными самцами и самками: # – при $P < 0,05$.

Таблица 2

Индекс эмоциональной реактивности интактных (И.) и адреналэктомированных (АЭ) самцов и самок крыс без и после стресса при многопараметрическом тестировании на протяжении суточного цикла

Животные, препарат	Время тестирования								Итого
	9	12	15	18	21	24	3	6	
И. физ. р-р самцы n=79	3,7+ 0,4	2,7+ 0,45	2,3+ 0,37	2,8+ 0,39	3,6+ 0,22	3,3+ 0,42	3,11+ 0,54	2,2+0,42	2,96+ 0,2
И. физ. р-р самки n=78	2,89+ 0,48	3,1+ 0,46	2,8+ 0,29	3,44+ 0,38	4,9+ 0,46	3,3+ 0,52	3,4+ 0,48	3,67+0,52	3,44+ 0,23
И. стресс физ. р-р самцы n=69	3,83+ 0,6	3,13+ 0,35	3,43+ 0,53	3,1+ 0,55	4,0+ 0,49	4,56+ 0,65	3,33+ 0,56	2,9+0,57	3,54+ 0,2 #
И. стресс физ. р-р самки n=76	3,73+ 0,40	3,91+ 0,28	3,69+ 0,47	3,56+ 0,5	3,6+ 0,34 #	3,63+ 0,32	3,25+ 0,56	4,0+1,03	3,67+ 0,08
АЭ физ. р-р самцы n=60	2,5+ 0,45	3,8+ 0,29	3,8+ 0,29	3,5+ 0,34	3,2+ 0,49	4,2+ 0,8	2,4+ 0,75	4,2+0,66	3,45+ 0,25
АЭ физ. р-р самки n=40	3,5+ 0,56	3,2+ 0,37	3,2+ 0,49	5,17+ 0,31	4,0+ 0,91	2,6+ 0,24	3,8+ 0,2	3,83+0,79	3,66+ 0,27
АЭ стресс, физ. р-р самцы n=60	2,6+ 0,37	3,2+ 0,2	3,1+ 0,18	3,5+ 0,34	2,8+ 0,37	2,2+ 0,2 #	2,0+ 0,71	3,2+0,58	2,83+ 0,19
АЭ стресс, физ. р-р самки n=79	3,0+ 10,5	4,6+ 0,4 #	4,8+ 0,8	4,25+ 0,53	2,0+ 0,01 #	3,8+ 0,66	4,0+ 0,63	4,0+0,82	3,82+ 0,32

Достоверные отличия между стрессированными и не стрессированными контрольными соответственно интактными и адреналэктомированными самцами и самками: # – при $P < 0,05$.

2. Тестирование интактных стрессированных животных.

Под влиянием стресса у контрольных самцов, получавших физиологический раствор, по сравнению с контрольными не стрессированными самцами средний ИДА несколько повышался. В течение суток показатель был достоверно выше в 18 ч и ниже – в 6 ч ($p < 0,05$) (табл. 1). Средний ИЭР у контрольных самцов, подвергнутых стрессу, был больше, нежели у самцов, получавших физиологический раствор без стресса (119,6%, $p < 0,05$) (табл. 2).

Средний ИДА контрольных стрессированных самок был выше, чем у самок крыс, не подвергавшихся стресс-процедуре. На протяжении суточного цикла показатель моторной активности на фоне стресса был достоверно выше в 24 и 6 ч, ниже – в 18 ч ($p < 0,05$). Средний ИЭР у контрольных самок, подвергнутых стрессу, был несколько выше, чем у самок крыс без стресса. Однако в 21 ч показатель эмоциональности на фоне стресса был даже ниже, чем у не стрессированных самок (73,4%; $p < 0,05$).

Введение диазепама изменяло поведенческие ответы стрессированных животных. Средний ИДА на фоне транквилизатора в дозе 0,1 мг/кг у самцов был выше, чем в контрольной стрессированной группе крыс-самцов, получавшей физиологический раствор ($p < 0,05$). Отличия наиболее заметны были в 6 ч ($p = 0,052$). У самок при аналогичном тестировании также отмечали более высокий средний ИДА ($p < 0,001$). На протяжении суточного цикла повышение показателя у самок регистрировали в 9 ($p < 0,05$), 12 и 18 ($p < 0,01$) ч (рис. 1А II). Следовательно, седативный эффект диазепама в дозе 0,1 мг/кг у самцов при стрессировании немного усиливался и

проявлялся в утреннее время, а у самок заметно усиливался в утренние, дневные и ранние вечерние часы.

Средний ИЭР самцов при использовании транквилизатора в малой дозе после стресса достоверно снижался ($p < 0,01$). У стрессированных самок препарат вызывал некоторое снижение среднего показателя эмоциональности (рис. 2А II). Таким образом, отмечалось небольшое противотревожное влияние диазепама у стрессированных крыс, более отчетливое у самцов.

При введении анксиолитика в большей дозе у самцов после стресса средний ИДА был высок по сравнению с контрольными стрессированными самцами. Различия в течение суток наиболее заметны были в 6 ($p < 0,01$) и 21 ч ($p < 0,05$). При подобном тестировании самок регистрировали более высокий средний ИДА ($p < 0,001$), нежели в контрольной группе. На протяжении суточного цикла при этом было выявлено достоверное повышение показателя в 12 ($p < 0,05$), 18 ($p < 0,01$) и 3 ч ($p < 0,001$). ИДА у самок также несколько повышался в 21 и 24 ч, однако сдвиг при этом не был достоверен (рис. 1Б II). Тем самым, показано, что при стрессировании седативный эффект диазепама (0,5 мг/кг) у самцов ослаблялся и проявлялся в вечерние и ранние утренние часы, а у самок усиливался, заметнее – в дневное, вечернее и ночное время.

На фоне диазепама в дозе 0,5 мг/кг у самцов, подвергнутых стресс-процедуре, средний ИЭР несколько снижался по сравнению с контрольными данными. На протяжении суток некоторое снижение показателя у самцов было отмечено в утренние и дневные часы. У самок средний показатель эмоциональности также немного уменьшался. Достоверно низкий ИЭР у самок наблюдался в 9 ч ($p < 0,05$)

(рис. 2Б II). Таким образом, установлено, что после стресса противотревожное влияние диазепама в дозе 0,5 мг/кг у самцов, в целом, ослабевало, а у самок слабый эффект отмечался утром.

3. Тестирование адrenaлэктомированных крыс.

Достоверных различий между ложнооперированными и интактными крысами выявлено не было, поэтому сравнения проводили между АЭ и интактными крысами. После адrenaлэктомии отмечалась тенденция к повышению средних ИДА и ИЭР у контрольных самцов и самок. Заметные изменения были у самцов (табл. 1, 2).

При введении 0,1 мг/кг диазепама средний ИДА у АЭ самцов был несколько выше, чем у контрольных самцов без надпочечника. Индекс активности при этом колебался в течение суток, с максимумом в 18 ч. У самок средний ИДА немного повышался. В течение суток тенденцию к повышению индекса наблюдали ночью, а к снижению – в 18 ч (рис. 1А III).

Средний ИЭР на фоне 0,1 мг/кг диазепама у самцов без надпочечника несколько снижался. Минимум в течение суток отмечали в 15 ч. У самок средний ИЭР также немного уменьшался. При колебаниях на протяжении суточного цикла индекс эмоциональности у самок повышался в 24 ч (рис. 2А III).

При введении 0,5 мг/кг диазепама у АЭ самцов средний ИДА был больше, чем в контрольной группе крыс-самцов. На протяжении суток тенденция к повышению показателя была отмечена в 15 и 18 ч, и к снижению – в 6 ч. При тестировании самок регистрировали некоторое снижение среднего ИДА. При этом в течение суточного цикла было выявлено небольшое повышение индекса утром и снижение днем (рис. 1Б III).

Средний ИЭР у самцов, подвергнутых адrenaлэктомии, на фоне 0,5 мг/кг диазепама достоверно снижался по сравнению с контрольными результатами ($p < 0,05$). На протяжении суток снижение показателя было отмечено в 6, 12, 15, 18 ч. У самок средний индекс эмоциональности несколько уменьшался. Достоверно низкая реактивность у самок наблюдалась в 18 ч (рис. 2Б III).

Таким образом, после адrenaлэктомии отмечен седативный эффект диазепама (0,1 мг/кг) у самцов вечером и анксиогенный у самок ночью. Противотревожное влияние диазепама (0,5 мг/кг) у АЭ самцов наблюдали утром, днем и вечером, а у самок – вечером.

4. Тестирование адrenaлэктомированных стрессированных животных.

У контрольных стрессированных АЭ самцов, получавших физиологический раствор, по сравнению с контрольными АЭ не стрессированными самцами средний ИДА был несколько больше. Средний ИЭР у контрольных самцов, подвергнутых стрессу, был ниже, чем у самцов, получавших физиологический раствор без стресса (82,0%, $p = 0,051$). При сравнении индексов на протяжении суточного цикла заметные отличия выявлены были в 15 ($p = 0,055$) и 24 ч ($p < 0,05$) (табл. 1, 2).

Анализ поведения контрольных стрессированных АЭ самок выявил более низкий средний ИДА, чем у АЭ самок крыс, не подвергавшихся стресс-процедуре (75,3%; $p < 0,05$). На протяжении суточного цикла показатель моторной активности на фоне стресса был несколько ниже, чем в контрольной группе, в 18 и 21 ч. Средний ИЭР у контрольных самок без надпочечника, получавших стресс, немного превышал уровень в контрольной группе АЭ особей без стресса. На протяжении суток показатель был выше

в 12 (143,8%, $p < 0,05$) и ниже в 21 ч (50%, $p < 0,05$) (табл. 1, 2).

При введении диазепама в дозе 0,1 мг/кг средний ИДА АЭ самцов со стрессом был сравним с данными контрольной стрессированной группы АЭ самцов. Однако в течение суток отмечали изменение ИДА крыс, с максимумом в 24 и минимумом в 18 ч. У самок при аналогичном тестировании более выражено изменялся среднесуточный ИДА. На протяжении суток повышение показателя у самок регистрировали в дневное и ночное время, достоверно – в 24 ч ($p < 0,05$), снижение – в 18 ч (рис. 1А IV). Следовательно, седативный эффект диазепама (0,1 мг/кг) проявлялся у АЭ самок при стрессировании в ночное время.

Средний ИЭР у самцов крыс без одного надпочечника при использовании транквилизатора в малой дозе после стресса несколько повышался. В течение суток тенденцию к снижению показателя эмоциональности отмечали в 18 ч, а к повышению – в 3 ч. У стрессированных АЭ самок средний ИЭР на фоне 0,1 мг/кг препарата имел тенденцию к уменьшению. При этом у самок он немного снижался в 15 и 18 ч и повышался в 21 ч (рис. 2А IV). Таким образом, на фоне стресса и односторонней адреналэктомии отмечалось слабое противотревожное влияние диазепама у самок крыс.

При введении большей дозы исследуемого вещества у АЭ самцов на фоне стресса средний ИДА был несколько выше, нежели в контрольной АЭ стрессированной группе крыс. На протяжении суток повышение ИДА отмечали в 18 ч ($p < 0,01$). У АЭ самок, получавших 0,5 мг/кг диазепама после стресса, регистрировали сходное изменение среднего ИДА, однако в течение суток индекс достоверно повышался в 15 и 18 ч ($p < 0,05$)

(рис. 1Б IV). Тем самым, установлено, что после адреналэктомии и стресса седативный эффект диазепама (0,5 мг/кг) у самцов проявлялся вечером, у самок – в дневные и вечерние часы.

Диазепам в большей дозе, не изменяя средний ИЭР у самцов, подвергнутых адреналэктомии и стресс-процедуре, на протяжении суток снижал показатель в ранние утренние и повышал в ночные часы ($p < 0,05$). У самок средний показатель эмоциональности, напротив, препаратом достоверно снижался ($p < 0,05$). Заметно низкие индексы при этом были отмечены в 12 ($p < 0,01$), 15 ($p < 0,05$) и 18 ч ($p < 0,01$) (рис. 2Б IV). Следовательно, после односторонней адреналэктомии противотревожное влияние диазепама в дозе 0,5 мг/кг у стрессированных самцов отмечалось в ранние утренние часы, а у самок – в дневное и вечернее время. Суммарный эффект препарата был выраженнее у самок. Кроме того, у самцов было выявлено анксиогенное действие ночью.

Обсуждение результатов

Таким образом, под влиянием стресса у интактных самцов отмечалось ослабление седативного эффекта и смещение его на ранние утренние часы. У интактных самок стресс усиливал седативное влияние диазепама и сдвигал его на дневные, вечерние и ночные часы, а также нивелировал активирующее действие.

После стресса у интактных самцов анксиогенный эффект малой дозы диазепама нивелировался, появлялось небольшое суммарное противотревожное влияние. В дозе 0,5 мг/кг противотревожная активность транквилизатора у самцов заметно ослаблялась. У интактных самок появлялась слабая противотревожная активность малой дозы диазепама. В большей дозе у стрессированных самок

анксиогенное действие препарата нивелировалось, противотревожный эффект с вечерних часов смещался на утренние.

После адреналэктомии у самцов по сравнению с интактными особями седативное и противотревожное действие диазепама ослаблялись, а анксиогенное не проявлялось. У самок после удаления надпочечника седативный и активирующий эффекты нивелировались, противотревожная активность смещалась на ранние вечерние часы, а анксиогенное действие проявлялось при введении 0,1 мг/кг диазепама и не отмечалось в дозе 0,5 мг/кг.

По сравнению с АЭ крысами без стресса после стрессирования АЭ самцов седативный эффект малой дозы диазепама нивелировался и, напротив, проявлялся на фоне большей дозы транквилизатора вечером. У АЭ самок после стресса седативный эффект малой дозы усиливался ночью, а большей – днем и вечером.

Также у АЭ стрессированных самцов появлялась тенденция, а у самок нивелировалось анксиогенное действие малой дозы диазепама. На фоне большей дозы препарата у АЭ стрессированных самцов нивелировалось противотревожное и проявлялось анксиогенное действие, у самок отмечался достоверный противотревожный эффект, особенно выраженный в дневные и вечерние часы.

Выявленное ослабление после стресса седативной, активирующей и противотревожной активности диазепама у интактных и АЭ самцов крыс согласуется с наблюдениями других авторов. Для анксиолитических препаратов под влиянием стресса разной этиологии установлено существенное уменьшение антиконфликтного эффекта у самцов, что объясняется стрессиндуцированным па-

дением бензодиазепиновой рецепции [14, 19]. Традиционные анксиолитики бензодиазепинового строения (диазепам, феназепам, клоназепам, алпрозолам, медазепам) после стресса оказывают проагрессивное действие, что выражается в снижении порогов агрессивной реакции [15].

Сохранение после стресса в утреннее время противотревожной активности большей дозы диазепама у интактных и усиления эффекта у АЭ самок, но не у самцов, вероятно, может быть связано со стресс-протективными свойствами эстрогенов, усиливающих функции тормозных ГАМК-механизмов [3, 5, 8, 13, 21]. С другой стороны, активность женской половой системы снижается при стрессировании, обусловленном активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Кортизол при этом подавляет секрецию гонадотропин-рилизинг-фактора в гипоталамусе, лютеинизирующего гормона в гипофизе и эстрадиола в яичниках. Также кортизол снижает чувствительность различных тканей к эстрадиолу. В свою очередь, репродуктивная система посредством эстрадиола оказывает положительное влияние на оба звена стрессовой системы, стимулируя секрецию кортикотропин-рилизинг-гормона и подавляя обратный захват и расщепление катехоламинов [20, 23]. С этим, возможно, связано усиление противотревожного эффекта диазепама у самок в условиях односторонней адреналэктомии, при снижении уровня кортизола, когда гормон менее выражено ограничивает чувствительность к эстрогенам.

Установленные половые различия в спектре активности транквилизатора, несомненно, связаны с психофизиологическими особенностями и стрессреактивностью мужского и женского

организмов; отличиями в деятельности нейромедиаторных систем мозга, в свою очередь, определяемыми психотропными свойствами половых гормонов, прежде всего, эстрогенов [6, 8, 12]. Гормональный дисбаланс на протяжении овариально-менструального (эстрального) цикла, безусловно, сказывается на характере психофармакологической реакции [3, 5, 6, 13]. Кроме того, различия в чувствительности к диазепаму, конечно, могут быть объяснены половыми особенностями фармакодинамики препарата, отличиями в хронэргии и хронестезии [4, 10, 11]. Также, вероятно, отличия в действии бензодиазепина у самок и самцов крыс могут быть обусловлены половыми особенностями фармакокинетики веществ. Действительно, в клинических исследованиях было обнаружено, что продолжительность фармакологического эффекта транквилизаторов может варьировать в зависимости от пола пациентов. При этом установлено, что выведение новых производных бензодиазепинов замедлено у женщин. Так, клиренс золпидема ниже у женщин, чем у мужчин (3,5 против 6,7 мл/мин/кг) [21]. Еще одной из причин половых различий в фармакологической чувствительности могло бы служить ингибирующее влияние эстрогенов (диэтилстильбестрола, эстрадиола) на ГАМК-бензодиазепиновые рецепторные комплексы. Изменяется как аффинность, так и плотность подобных рецепторов во фронтальной коре и мозжечке животных [8, 12].

Таким образом, выполненное исследование выявило диссимилиацию двигательных и эмоциональных ответов у интактных и адrenaлэктомированных самцов и самок крыс при введении диазепама на протяжении суточного цикла без и после стресса.

Выводы

1. Стресс у интактных самцов заметно ослабляет седативный эффект диазепама, смещая его на ранние утренние часы, а у самок – усиливает, индуцируя, и в вечернее время. Стрессирование нивелирует активирующее действие препарата у самок крыс.

2. Стресс существенно ослабляет противотревожную активность диазепама у интактных самцов, у самок – смещает с вечерних часов на утренние, а также нивелирует «анксиогенное» действие у самцов и самок.

3. Адrenaлэктомия ослабляет седативное и противотревожное, нивелирует анксиогенное действие диазепама у самцов. У самок удаление надпочечника нивелирует седативный и активирующий эффекты, смещает на ранние вечерние часы противотревожную активность, а также индуцирует анксиогенное действие транквилизатора в дозе 0,1 мг/кг и нивелирует в дозе 0,5 мг/кг.

4. Стресс на фоне адrenaлэктомии нивелирует седативный эффект малой и индуцирует при введении большей дозы диазепама, существенно ослабляет противотревожное и индуцирует анксиогенное влияние у самцов крыс. Стрессирование АЭ самок усиливает седативный и противотревожный эффекты, нивелирует анксиогенное действие транквилизатора.

Список литературы

1. Айрапетянц М. Г. Механизмы патогенеза неврозов // Журн. высш. нерв. деятельности им. Павлова. 2005. т. 55. № 6. С. 734-746.
2. Александровский Ю. А. Пограничные психические расстройства: Учебное пособие для слушателей системы последипломного образования. Изд. 3-е,

- перераб., доп. – М.: Медицина. 2000.
3. Бабичев В. Н. Нейроэндокринный эффект половых гормонов // Успехи физиол. наук. 2005. т. 36. № 1. С. 54-67.
 4. Батурич В. А., Манвелян Э. А. Противотревожная активность психотропных препаратов у самок и самцов крыс в разное время суток // Экология человека. 2006. № 4/2. С. 47-49.
 5. Батурич В. А., Манвелян Э. А., Булгакова М. Д. Влияние стресса на галоперидоловую каталепсию у интактных и овариоэктомированных самок крыс в разное время суток // Эксперим. и клин. фармакол. 2012. т. 75. № 5. С. 3-6.
 6. Бардеништейн Л. М., Ершова А. В. Предменструальный синдром с преобладанием аффективных нарушений: от клинико-патогенетических особенностей к новым возможностям терапии // Рос. психиатр. журн., 2006. № 5. С. 79-84.
 7. Кабак Я. М. Практикум по эндокринологии. Основные методики экспериментально-эндокринологических исследований. – М.: Изд-во Московского университета. 1968. 276 с.
 8. Манвелян Э. А. Половая диссимилиация эффектов психотропных средств. – Ставрополь: Изд-во Ставропольского государственного университета. 2008. 106 с.
 9. Манвелян Э. А., Анисимова Н. А. Циркадианные различия эффективности диазепама у стрессированных самок и самцов крыс // Вестник СГУ. 2011. Выпуск 74. № 3. С. 46-52.
 10. Манвелян Э. А., Анисимова Н. А. Влияние диазепама на поведение самок и самцов крыс при многопараметрическом тестировании на протяжении суточного цикла // В кн.:

«Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» – М. Изд-во «Фолиум». 2010. 60 с.

11. Манвелян Э. А., Батурич В. А. Половые и хронобиологические различия в активности диазепама у крыс в тесте конфликтной ситуации // Эксперим. и клин. фармакол. 2008. № 4. С. 11-13.
12. Манвелян Э., Батурич В. Гендерные различия в эффектах психотропных препаратов. – Saarbrücken: Lap-publishing.com. 2011. 126 с.
13. Манвелян Э. А., Батурич В. А., Булгакова М. Д. Циркадианные различия интенсивности галоперидоловой каталепсии у овариоэктомированных самок крыс без и после эстрогенизации // «Биомедицина». 2012. № 2. С. 14-21.
14. Молодавкин Г. М., Воронина Т. А., Рамхин Е. Я., Мелетова О. К. Изменение антиконфликтного действия анксиолитиков под влиянием стресса // Эксперим. и клин. фармакол. 2002. т. 65. № 4. С. 3-6.
15. Молодавкин Г. М., Воронина Т. А., Алдармаа Ж., Мелетова О. К. Изменение антиагрессивного действия анксиолитиков под влиянием стресса // Эксперим. и клин. фармакол. 2004. т. 67. № 4. С. 3-6.
16. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М. МедиаСФЕРА. 2002. 212 с.
17. Филаретова Л. П. Стресс в физиологических исследованиях // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2010. т. 96. № 9. С. 924-935.
18. Родина В. И., Крупина Н. А., Крыжановский Г. Н., Окнина Н. Б. Мно-

- гопараметровый метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний у крыс // Журн. высш. нерв. деятельности им. Павлова. 1993. № 5. С. 1006-1017.
19. **Яркова М.А., Чекина К.С., Середенко С.Б.** Стрессиндуцированное падение бензодиазепиновой рецепции и ее фармакологическая коррекция // В кн.: «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» – М. Изд-во «Фолиум». 2010. 10 с.
20. **Bale T.L., Vale W.W.** CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004. v. 44. P. 525-557.
21. **Greenblatt D.G., Harmatz J.S., Moltke L.L., et. al.** Comparative kinetics to the response to the benzodiazepine agonists triazolam and zolpidem: evaluation of sex-dependent differences // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000. v. 293. P. 435-443.
22. **McEwen B.S.** Estrogen actions throughout the brain // *Rec/ Progress Horm. Res.*, 2002. v. 57. P. 357-384.
23. **Tache Y., Brunhuber S.** From Hans Selye's discovery of biological stress to the identification of corticotrophin-releasing factor signaling pathways: implications in stress-related functional bowel diseases // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008. v. 1148. P. 29-41.

Gender and circadian differences in the effects of diazepam in adrenalectomized and of stressed rats for testing multiparameter

Е.А. Manveljan, В.А. Baturin, N.А. Anisimova

Experiments on white Wistar rats the effects of stress on the effects of diazepam (0,1 and 0,5 mg/kg) in intact and adrenalectomized male and female rats examined with multi-parameter testing at 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 3 o'clock.

After stressing sedative effect of diazepam in intact males weakens, displacing the early morning hours and on the contrary in the female increases, inducing in the evening. In addition, stress the activating effect of the drug in females and anxiogenic effects in male and female rat's levels. Also, stressing significantly antianxiety activity of diazepam in intact males weakens, and in females dismissed by the evening time in the morning.

Adrenalectomy sedative and antianxiety attenuates it is shown, anxiogenic effects of diazepam in males negates. In females, the adrenal gland removal the sedative and activating effects eliminates, antianxiety activity shifts in the early evening time and the anxiogenic effects of tranquilizers in a dose of 0, 1 mg/kg induces and of 0, 5 mg/kg levels.

Stress on the background of adrenalectomy males sedative effect of low dose eliminates and high dose of diazepam induces, significantly antianxiety weakens and the anxiogenic effects of the drug induces. Sedative and antianxiety effects in adrenalectomized females after stressing reinforce, anxiogenic effects of tranquilizers eliminate.

Key words: diazepam, stress, adrenalectomy, gender and diurnal differences.

Моделирование хронической венозной недостаточности нижних конечностей

М.Б. Плотников, И.С. Иванов, А.В. Сидехменова, О.И. Алиев, Т.И. Фомина, Л.А. Ермолаева

НИИ фармакологии СО РАМН, Томск

Контактная информация: Плотников Марк Борисович, mbp2001@mail.ru

Целью исследования является разработка модели хронической венозной недостаточности нижних конечностей, воспроизводимой у крыс Wistar. Показано, что ограничение кровотока в каудальной полой вене проксимальнее правой почечной вены приводит к стабильной венозной гипертензии и сопровождается увеличением объема конечностей, повышенной адгезионной активностью лейкоцитов.

Предлагаемая модель хронической венозной недостаточности нижних конечностей является относительно нетрудоемкой и воспроизводит ряд характерных факторов патогенеза хронической венозной недостаточности у людей.

Ключевые слова: модель хронической венозной недостаточности, интерстициальный отек, венозное давление, адгезия лейкоцитов.

Введение

По данным различных авторов, от 20-25% трудоспособного населения экономически развитых стран страдает хронической венозной недостаточностью нижних конечностей (ХВННК) [5]. Поиск подходов к изучению патогенеза и рациональной терапии ХВННК затруднен отсутствием адекватной модели этого заболевания в связи с тем, что данная патология не характерна для животных [2].

В основе используемых методов моделирования венозной недостаточности лежат два подхода: 1 – затруднение оттока крови из венозного бассейна (модели окклюзии магистральных вен) [8, 10, 12]; 2 – увеличение объема крови, поступающей в венозное русло (модель артерио-венозной анастомоза) [8, 10, 12, 16]. Использование первого подхода позволяет воспроизвести процессы местного воспаления на фоне повышенного венозного давления. Второй подход, кроме всего прочего, позволяет смоделировать клапанную недостаточ-

ность вен и даже воспроизвести клиническую картину варикозного расширения вен, хотя последнее касается только крупных лабораторных животных [8, 10, 11, 12, 16]. Очевидно, что существующие модели ХВННК воспроизводят лишь отдельные патогенетические звенья заболевания и практически не сопровождаются клиническими проявлениями, характерными для пациентов с ХВННК [8, 10, 16].

Поэтому актуальной проблемой является разработка новых моделей ХВННК, воспроизводящих большинство патогенетических звеньев заболевания и характерные клинические проявления (отек, дерматит кожи, изъязвление и др.).

Целью настоящего исследования является разработка модели хронической венозной недостаточности нижних конечностей, воспроизводимой у крыс Wistar, сопровождающейся венозной гипертензией, признаками местного воспаления, интерстициальным отеком и увеличением объема задних конечностей.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 24 конвенциональных крысах-самцах Wistar массой 250-350 г. Животные получены из лаборатории экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии СО РАМН. Крыс содержали в условиях лабораторного вивария на естественном световом режиме и стандартной диете при свободном доступе к воде и пище.

ХВННК создавали путем ограничения кровотока в полой вене. Для этого у животных под эфирным наркозом проводили лапаротомию, выделяли участок каудальной полой вены проксимальнее правой почечной вены и подводили под него лигатуру. После чего в бедренную вену вводили гепарин в дозе 250 ЕД/кг и осуществляли частичную окклюзию каудальной полой вены. Для этого на участок полой вены помещали иглу диаметром 0,8 мм и перевязывали поую вену. Затем иглу удаляли, частично восстанавливая просвет сосуда. У ложноперирированных животных полностью повторяли оперативное вмешательство, исключая этап окклюзии сосуда.

На 7-е и 14-е сутки у животных оценивали объем стопы задних конечностей, измеряли венозное давление и забирали часть мышцы голени для приготовления гистологических препаратов. Кроме того, в отдельной серии экспериментов оценивали адгезионную активность лейкоцитов на 14-е сутки после частичного лигирования.

Объем стопы задних конечностей определяли онкометрическим методом.

Перед измерением давления крыс наркотизировали диэтиловым эфиром, затем внутривенно вводили гепарин в дозе 250 ЕД/кг. Давление в каудальной полой вене измеряли прямым методом на уровне впадения в нее подвздошной вены. Доступ осуществлялся через бедренную вену.

Пробы крови забирали у крыс из общей

сонной артерии под эфирным наркозом (стабилизировали гепарином 25 ЕД/мл). Суспензию лейкоцитов получали в градиенте плотности при центрифугировании (1 мл фиколл-верографин + 4 мл крови; 30 мин при 1500 об./мин). Лейкоциты дважды отмывали раствором Хэнкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}), центрифугируя при 1000 об./мин в течение 15 мин. Осадок ресуспендировали в 5 мл раствора Хэнкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) [1]. Полученную суспензию лейкоцитов (40 мкл) помещали в капилляр с внутренним диаметром 1 мм, предварительно обработанный раствором Дюльбекко. Клетки инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. Клеточную взвесь удаляли из капилляра при напряжении сдвига, создаваемом давлением 0,05 кгс/см². После чего капилляр заполняли раствором Дюльбекко и освобождали от содержимого уже при напряжении сдвига, создаваемом давлением 0,225 кгс/см² [13]. Число клеток подсчитывали в исходной суспензии, а также первом (неадгезировавшие и с малой силой сцепления) и втором (со средней силой сцепления) смыве, используя камеру Горяева. Из полученных данных рассчитывали число клеток, оставшихся в капилляре (с большой силой сцепления).

После эвтаназии (передозировка эфирного наркоза) у животных забирали часть мышцы голени. Для гистологического исследования кусочки мышц фиксировали в 10% нейтральном формалине, затем обезвоживали в серии спиртов восходящей концентрации, заливали в парафин и изготавливали поперечные срезы толщиной 5 мкм. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. На гистологических препаратах мышцы голени с помощью программы «Adobe Photoshop CS2» оценивали площадь интерстициального пространства по отношению к стандартной площади

Таблица 1

Венозное давление (мм вод.ст.) у ложноперирированных крыс (ЛО) и крыс с частичной окклюзией полой вены (ОВ) на 7-е и 14-е сутки

Группа животных	7-е сутки	14-е сутки
ЛО, n=5	40,4±5,6	40,8±2,9
ОВ, n=5	112,4±7,6*	112,0±3,7*

* – p<0,05 по сравнению со значениями у ложноперирированных животных.

Таблица 2

Объем лап (V, мл) у ложноперирированных крыс (ЛО) и крыс с частичной окклюзией полой вены (ОВ) на 7-е и 14-е сутки

Группа животных	7-е сутки		14-е сутки	
	V исходный	V конечный	V исходный	V конечный
ЛО, n=5	1,76±0,04	1,86±0,05	1,91±0,02	1,89±0,01
ОВ, n=5	1,68±0,04	2,01±0,02*+	1,88±0,04	2,01±0,03*+

* – p<0,05 по сравнению со значениями у ложноперирированных животных;
+ – p<0,05 по сравнению с исходными значениями.

ткани (в %) в полях зрения при десятикратном увеличении.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего значения. Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали непараметрический критерий Mann-Whitney U test.

Результаты исследований

После частичной окклюзии полой вены развивается стойкая венозная гипертензия, сохраняющаяся в течение 14 суток (табл. 1). При этом как на 7-е, так и на 14-е сутки венозное давление в группе животных с частичной окклюзией полой вены было больше в 2,8 раза (p<0,05) по сравнению со значениями у ложноперирированных животных.

В обеих сериях (7-е и 14-е сутки) на фоне венозной гипертензии в группе контроля наблюдали достоверное увеличение объема стопы задних конечностей на 7-е сутки –

20%, на 14-е – 7% по сравнению с ложноперирированными животными (табл. 2).

При гистологическом исследовании выявлено увеличение интерстициального пространства на 25% на 14-е сутки по сравнению с животными ложноперирированной группы (p<0,05), что свидетельствует о признаках отека мышечной ткани (см. табл. 3, рис.).

На 14-е сутки у животных с частичной окклюзией каудальной полой вены наблюдалось достоверное повышение доли лейкоцитов с большой силой сцепления в 2,6 раза и снижение доли неадгезировавших лейкоцитов и лейкоцитов с малой силой сцепления в 1,6 раза по сравнению с ложноперирированными животными (табл. 4).

Обсуждение результатов

Основную роль в формировании ХВННК у пациентов играют гемодинамические нарушения, вызванные повышенным давлением в венозном русле [3, 5, 15]. В условиях воспроизводимой нами модели ХВННК венозная гипертензия является

одним из ключевых факторов патогенеза и сохраняется в течение 14 суток, что свидетельствует о стабильности модели.

При исследовании изменения объема конечности установлено, что более выраженные изменения проявляются на ранних этапах после окклюзии. Снижение объема конечностей на 14-е сутки по сравнению с 7-ми может быть вызвано как перераспределением жидкой части крови в прилегающие ткани, так и развитием артериоловеноулярных анастомозов, отмеченным рядом авторов [4, 5, 9].

В свою очередь, перераспределением жидкой части крови из сосудистого русла в ткани (происходящим со временем) можно объяснить развитие отека мышечной ткани на 14-е сутки, что мы наблюдали в увеличении интерстициального пространства и частичном уменьшении объема стоп задних лап у крыс. Переходу жидкости, видимо, способствуют венозная гипертензия, воспаление и оксидантный стресс, а также нарушение механических свойств сосудов и повышение проницаемости капилляров [3, 4, 5, 9, 14, 18].

Одним из факторов патогенеза ХВННК является активация лейкоцитов и взаимодействие их с эндотелием сосудов, что рассматривается как элемент воспаления [3, 5, 7, 17]. Гипотеза лейкоцитарной агрессии показана на модели артерио-венозного анастомоза и при окклюзии брыжеечной вены [8, 16]. На предлагаемой нами модели частичной окклюзии каудальной полой вены также выявлено повышение адгезионной активности лейкоцитов, что может свидетельствовать о развитии воспалительных процессов. Поэтому с точки зрения формирования ХВННК, наиболее характерные изменения показателей наблюдали на 14-е сутки. Патологические изменения в данный временной период касались как сосудистого русла, так и прилегающих тканей и клеток крови.

Таким образом, предлагаемая модель хронической венозной недостаточности нижних конечностей воспроизводит ряд характерных факторов патогенеза и клинических проявлений заболевания у пациентов и может использоваться в экспериментах по оценке активности флеботропных средств.

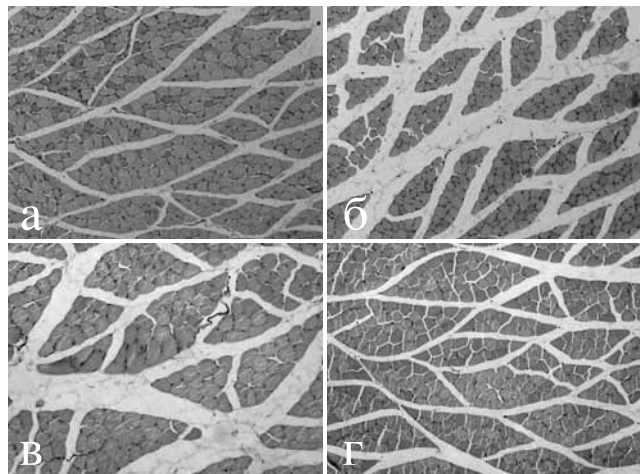


Рис. Мышцы голени крыс. а и б – соответственно, ложнооперированные животные и животные с частичной окклюзией полой вены на 7-е сутки; в и г – соответственно, ложнооперированные животные и животные с частичной окклюзией полой вены на 14-е сутки. Отек интерстициального пространства. Окраска гематоксилином и эозином, х 150.

Таблица 3

Отношение площади интерстициального пространства к стандартной площади ткани (%) на гистологических препаратах мышцы голени у ложнооперированных крыс (ЛО) и крыс с частичной окклюзией полой вены (ОВ) на 7-е и 14-е сутки

Группа животных	7-е сутки	14-е сутки
ЛО, n=5	33,7±1,2	32,2±1,3
ОВ, n=5	35,1±1,4	40,0±1,2*

* – p<0,05 по сравнению со значениями ложнооперированных животных.

Таблица 4

Адгезионная способность лейкоцитов (%) у ложнооперированных крыс (ЛО) и крыс с частичной окклюзией полой вены (ОВ) на 14-е сутки

Группа животных	Неадгезировавшие лейкоциты и лейкоциты с малой силой сцепления, %	Лейкоциты со средней силой сцепления, %	Лейкоциты с большой силой сцепления, %
ЛО, n=7	60,3±5,2	22,4±2,7	17,4±6,1
ОВ, n=7	37,6±4,1*	20,3±3,5	42,7±4,6*

* – p<0,05 по сравнению со значениями у ложнооперированных животных.

Выводы

1. Ограничение кровотока в каудальной полой вене проксимальнее правой почечной вены приводит к стабильной венозной гипертензии.
2. Частичная окклюзия каудальной полой вены проксимальнее правой почечной вены сопровождается увеличением объема конечности, отеками явлениями в мышечной ткани, повышенной адгезионной активностью лейкоцитов, которые являются характерными клиническими проявлениями и патогенетическими звеньями ХВННК у человека.

Список литературы

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. – Томск: Изд-во Том. ун-та. 1992:264 с.
2. Кириенко А.И., Григорян Р.А., Золотухин И.А. Современные принципы лечения хронической венозной не-

достаточности // Consilium medicum: журнал доказательной медицины для практикующих врачей. 2003. Т. 5. № 6, С. 361-366.

3. Ларионов М.В., Обыденов С.А., Хафизьянова Р.Х. Патогенез развития хронической венозной недостаточности и основные направления лечебной тактики // Казанский медицинский журнал. 2004. Т. 85. № 6. С. 433-436.
4. Поташов Л.В., Амосов В.И., Лапенкин С.В., и др. Патогенетические основы развития варикозной болезни вен нижних конечностей по данным динамической радионуклидной флебографии // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2005. Т. 4. С. 13-19.
5. Савельев В.С. Флебология. М: «Медицина». 2001. 660 с.
6. van Bemmelen S.P., Hoynck van Papendrecht A.A., Hodde K.C., Klopffer P.J. A study of valve incompetence that developed in an experimental model

- of venous hypertension // Archives of surgery. 1986. № 121. P. 1048-1052.
7. **Bergan J.** Molecular mechanisms in chronic venous insufficiency // Annals of Vascular Surgery. 2007. № 21. P. 260-266.
 8. **Bergan J.J., Pascarella L., Schmid-Schönbein G.W.** Pathogenesis of primary chronic venous disease: Insights from animal models of venous hypertension // Journal of Vascular Surgery. 2008. Vol. 47. № 1. P. 183-192.
 9. **Burnand K.G., Clemenson G., Whimster I., et al.** The effect of sustained venous hypertension on the skin capillaries of the canine hind limb // The British journal of surgery. 1982. № 69. P. 41-44.
 10. **Dalsing M.C., Ricotta J.J., Wakefield T., et al.** Animal models for the study of lower extremity chronic venous disease: Lessons learned and future needs // Annals of Vascular Surgery. 1998. Vol. 12. № 5. P. 487-494.
 11. **Jones G.T., Grant M.W., Thomson I.A., et al.** Characterization of a porcine model of chronic superficial varicose veins // Journal of Vascular Surgery. 2009. Vol. 49. № 6. P. 1554-1561.
 12. **Jones G.T.** Animal models in chronic venous disease // Medicographia, Vol. 30, № 2, p. 154-156. 2008.
 13. **Mege J., Eon B., Saux P., et al.** Inhibition of granulocyte adhesion by pentoxifylline and analogues: Effect on leukocyte function // Proceedings of the workshop, France. 1989. P. 17-23.
 14. **Ojdana D., Saftejko K., Lipska A., et al.** The inflammatory reaction during chronic venous disease of lower limbs // Folia Histochemica et Cytobiologica. 2009. Vol. 47. № 2. P. 185-189.
 15. **Pascarella L., Penn A., Schmid-Schönbein G.W.** Venous hypertension and the inflammatory cascade: major manifestations and trigger mechanisms // Angiology. 2005. Vol. 56 № 1. P. 3-10.
 16. **Pascarella L., Schmid-Schönbein G.W., Bergan J.** An animal model of venous hypertension: The role of inflammation in venous valve failure // Journal of Vascular Surgery. 2005. № 41. P. 303-311.
 17. **Takase S., Bergan J.J., Schmid-Schönbein G.W.** Expression of adhesion molecules and cytokines on saphenous veins in chronic venous insufficiency // Annals of Vascular Surgery. 2000. № 14. P. 427-435.
 18. **Weingarten M.S.** State of the art treatment of chronic venous disease // Clinical Infectious Diseases. 2001. Vol. 32. № 6. P. 949-954.

Model of chronic venous insufficiency in hind limbs

**M.B. Plotnikov, I.S. Ivanov, A.V. Sidekhmenova,
O.I. Aliev, T.I. Fomina, L.A. Ermolaeva**

The purpose of this research is the development of chronic venous model insufficiency in lower limbs of Wistar rats. Blood flow limitation in caudal vena cava just below the right renal vein leads to stable venous hypertension, accompanied by increase of volume of the hind limbs and high adhesive activity of leucocytes. The offered model of chronic venous insufficiency of hind limbs is not labour-consuming and reproduces number of characteristic pathogenetic factors of chronic venous insufficiency in people.

Key words: model of chronic venous insufficiency, interstitial edema, venous pressure, adhesion of leucocytes.

Современные экспериментальные модели депрессии

**Н.А. Язуина, Ю.К. Комлева, А.Б. Салмина, М.М. Петрова, Г.А. Морозова,
Н.А. Малиновская, Г.Е. Герцог**

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск

Контактная информация: Язуина Нина Анатольевна, nina.a.k.85@mail.ru

В настоящем обзоре рассмотрены основные экспериментальные модели депрессии и методы оценки депрессивного поведения лабораторных животных. Животные модели достаточно перспективны для понимания психопатологии, но не как отклонений поведения, а как последовательности психологических процессов, подчиняющихся определенным законам. Создание моделей депрессии переживает период расцвета. Существует несколько моделей депрессии: хронического непредсказуемого стресса, стресса раннего периода жизни, социального стресса, выученной беспомощности, водно-иммерсионная модель. Многие из них опираются на определенные манипуляции с поведением животного, которые имеют известные биологические последствия. Изучение моделирования депрессии и поведения лабораторных животных при депрессии позволяет понять природу психопатологии у человека.

Ключевые слова: депрессия, модель хронического непредсказуемого стресса, модель стресса раннего периода жизни, модель социального стресса, модель выученной беспомощности, водно-иммерсионная модель.

Депрессия является одной из актуальных проблем современности, считаясь самым распространенным психическим заболеванием. От 45 до 60% всех самоубийств на планете совершают больные депрессией [1]. По прогнозам Всемирной Организации Здравоохранения, к 2020 году депрессия выйдет на первое место в мире среди всех заболеваний, обогнав инфекционные и сердечно-сосудистые. Депрессия — это психическое расстройство, характеризующееся «депрессивной триадой»: снижением настроения и утратой способности переживать радость, нарушениями мышления, двигательной заторможенностью. Ею страдает 10% населения в возрасте старше 40 лет, из них две трети — женщины. Среди лиц старше 65 лет депрессия встречается в три раза чаще. Общая распространённость депрессии в юношеском возрасте составляет от 15 до 40% [3]. Как известно, депрессия

— это заболевание, которое тяжелым бременем ложится на пациента, его семью, общество в целом, и в не меньшей степени, чем хронические соматические заболевания, препятствует полноценной жизнедеятельности. Вероятность наступления инвалидности у больных депрессией в 1,8 раза выше, чем у пациентов без этого психического расстройства [3].

Патогенез депрессии

Патогенез депрессий, рассматриваемый с системных позиций, включает в себя как морфофункциональный (нейро-анатомический, нейрофизиологический, нейрохимический), так и патопсихологический компоненты.

Более 40 лет доминировала моноаминовая теория развития депрессии, согласно которой депрессия связана с дефицитом одного из биогенных аминов: серотонина, норадреналина или дофамина (рис. 1).

Серотонин рассматривался как основной биогенный амин, обеспечивающий тимоаналептический эффект, противотревожное действие, влияние на пищевое и сексуальное поведение. В настоящее время считается, что дофамин принимает участие в регуляции моторной и целого ряда поведенческих реакций [5]. Моноаминовая гипотеза подтверждается тем, что многие антидепрессанты имеют общий механизм действия, т.е. блокируют обратный захват или ферментную оксидацию моноаминов [18].

Помимо классической моноаминовой теории депрессии, разрабатываются еще несколько подходов к изучению патогенеза [5, 17], включая оценку дисфункции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) системы и исследование анатомических и структуральных изменений в гиппокампе и других отделах мозга при депрессии. Известно, что на вероятность развития депрессии влияют особенности экспрессии генов, кодирующих переносчик серотонина (5HTT/SLC6A4), ре-

цептор серотонина 2A (HTR2A), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), триптофангидроксилаза (TPH2).

Кровь, моча и спинномозговая жидкость (ликвор) являются потенциальными источниками для идентификации биомаркеров депрессии. В крови и мозге при генетической модели депрессии, модели хронического непредсказуемого стресса и у пациентов с депрессией найдены следующие молекулы-биомаркеры: MARCKS, MAF, FAM46A, NAGA, UBE3A, CD59, ATP11C, RAPH1, SCAPER/ZNF291, TLR7 и IGSF4A/CADM1. Гены, кодирующие эти белки, принадлежат к трем функциональным категориям: участвующие в транскрипции, развитии нервной системы и в патогенезе нейродегенерации [29]. Картина еще более усложняется при сравнении величины влияния генов и образа жизни на вероятность развития болезни. Несмотря на эти препятствия, область психиатрической генетики стремительно развивается, и несколько новых техноло-

гических достижений (например, открытие целого генома) в ближайшее время будет доступно для крупномасштабных исследований. Важно помнить, что генетическая информация будет носить только дополнительный характер, т.к. сумма внутренних и внешних факторов способствует и влияет на развитие психических заболеваний [23, 24, 30, 34].

Кроме того, психологические факторы и стрессовые события, соматические заболевания, сопровождающиеся увеличением концентрации факторов роста, провоспалительных цитокинов, гормонов, могут вызывать морфологические и функциональные изменения в головном мозге, ассоциированные с развитием депрессии [31]. Эти изменения касаются нейротрансмиттерных и нейроэндокринных систем, регулирующих адаптивные реакции, таких как ГГН-система, глутаматергическая система [26], нейротрофические факторы [13]. Все эти системы, так или иначе, влияют на нейропластичность головного мозга, т.е. способность функционально и структурно адаптироваться к стимулам. Нейропластичность тесно сопряжена с синаптогенезом и элиминацией синапсов, нейрогенезом и апоптозом. Регионы головного мозга, нарушения пластичности и сопутствующие структурные изменения которых связаны напрямую с депрессией, включают гиппокамп, миндалину и префронтальную кору [13]. Гиппокамп давно рассматривается как область контроля над настроением, памятью, концентрацией внимания и обучением. Миндалевидное тело участвует в регуляции эмоций, страха, тревоги и агрессивности. Префронтальная кора отвечает за функции кратковременной памяти, принятия решений и инициативы [22].

В опытах на лабораторных животных (мыши, крысы, хомячки, низшие приматы

тупайя) показано, что в ситуациях хронического болевого, эмоционального или социального стресса (являющихся экспериментальными моделями депрессии) статистически достоверно уменьшается объем гиппокампа (до 10%, как и у больных депрессией), в зубчатой извилине (*gyrus dentata*) снижается число гранулярных клеток, а в полях CA1 и CA3 гиппокампа уменьшаются размеры тел пирамидных клеток и развивается атрофия их апикальных дендритов (до 50% длины) и дендритных шипиков, что ведет к нарушению нормального функционирования лимбической системы и ее связей с другими отделами мозга [2]. Изменения в этих структурах головного мозга, связанные с депрессией, включают уменьшение объема, особенно в гиппокампе и префронтальной коре [32, 33], размера и плотности нейронов [9], плотности глии [16, 28, 33], нарушение церебрального кровотока и метаболизма глюкозы [11]. Считается, что нарушения в указанных структурах головного мозга влияют на эмоции, настроение, память, когнитивные функции, что может приводить к развитию симптомов, типичных для депрессии [13].

Разработка новых адекватных моделей депрессии на животных является актуальной задачей современной нейробиологии, нейрофармакологии, неврологии и психиатрии. Современные модели депрессии на животных должны иметь некоторые нарушения функционирования центральной нервной системы, характерные для данного заболевания, которые возвращаются к норме при длительном приеме антидепрессантов [21].

Критерии оценки моделей на животных

1. Надежность – свойство модели, основанное на повторяемости направленно-

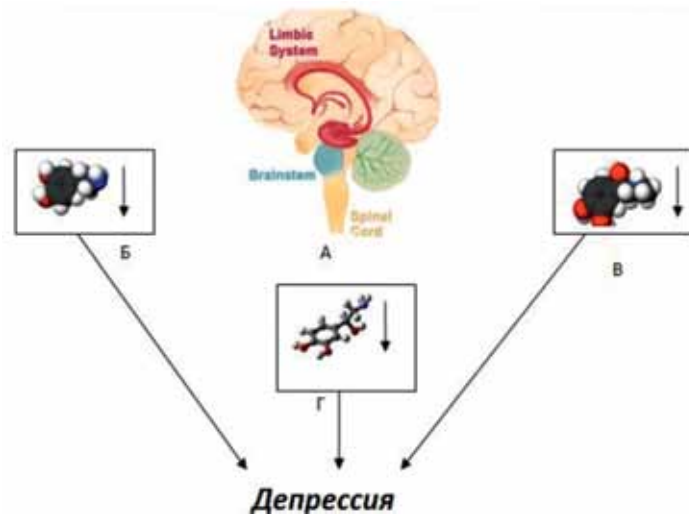


Рис. 1. Классическая моноаминовая теория депрессии.

А – лимбическая система головного мозга; Б – дофамин; В – адреналин; Г – норадреналин.

сти результатов у разных экспериментаторов, в разное время суток и года, а также в измененных условиях эксперимента.

2. Валидность – правомочность ее использования для адекватного моделирования соответствующей патологии:

- Face validity – поведенческие и эндокринные характеристики модели должны напоминать симптоматику моделируемой патологии.
- Etiological validity – этиология феномена в модели на животном и состоянии человека должны быть идентичны.
- Construct validity – модель должна воспроизводить механизмы патологии, т.е. согласоваться с существующими представлениями о механизме патологии.
- Predictive validity – фармакологические воздействия должны сходным образом влиять на характеристики модели и на симптоматику патологии.

3. Обоснованность.

4. Биоэтичность.

Обоснованность и надежность являются основными критериями оценки моделей на животных [19]. Наличие надежных и воспроизводимых экспериментальных систем имеет важное значение для научных исследований [15].

Классификация животных моделей депрессии [14]

Виды моделей:

1) модели повреждения:

- генетическая модель: трансгенные или нокаутные животные;
- модель удаления обонятельных луковиц.

2) модели стресса:

- острый стресс – водно-иммерсионная модель, модель «выученной беспомощности»;
- хронический стресс – хронический

непредсказуемой стресс;

3) социальные модели:

- модель стресса раннего периода жизни;
- модель социальной изоляции.

Модели повреждения.

Генетические модели депрессии на животных

Генетически модифицированные животные в настоящее время широко используются в качестве моделей для изучения патологии ЦНС человека, в том числе депрессии и тревоги. Для понимания генетической основы при депрессии изучаются генетические локусы у животных и людей. При исследовании генетических моделей детской депрессии на крысах линий Flinders Sensitive Line, Wistar Kyoto и Sprague-Dawley в препубертатном возрасте выраженные симптомы детской депрессии отмечаются у крыс линий Flinders Sensitive Line и Wistar Kyoto. Поведенческие и физиологические особенности генетических моделей депрессии на крысах линии Wistar Kyoto имеют зеркальное отражение по отношению к симптомам у пациентов с депрессией [29]. Нокаутные животные моделируют роль отдельных генов в механизме нарушений поведения и чувствительности к антидепрессантам. Мыши, нокаутные по следующим генам, предложены как модели депрессии: гены, кодирующие компоненты серотонинергической системы (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT₇, SERT); норадренергической системы (DβH, α_{2A}, α_{2C}, NET); MAO (MAO-A, MAO-B); опиатной системы (μ-рецептор, дельта опиоид рецептор); ГАМК (ГД, ГАМКВ); глутаматергической системы (NMDA δ₄ субъединица, mGluR7) и еще, по крайней мере, 25 других генов [8].

Достоинства и недостатки генетических моделей отражены в табл.

Модель удаления обонятельных луковиц

Удаление обонятельных луковиц является признанной моделью депрессии, которая была исследована, в основном, на крысах [20]. Обонятельная система крыс является частью лимбической, в которой миндалина и гиппокамп формируют эмоциональную память и компоненты поведения. Тем не менее, потеря обоняния, связанная с удалением обонятельных луковиц, не является основным фактором, влияющим на отклонения в поведении животного, как периферически индуцированная anosmia не вызывает те же изменения в поведении. Считается, что удаление обонятельных луковиц вызывает дисфункцию коры, гиппокампа, миндалины, и это лежит в основе поведенческих и других изменений. Таким образом, модель удаления обонятельных луковиц у крыс позволяет изучать активность антидепрессантов и взаимосвязь между структурами лимбической системы, которые также являются дисфункциональными у пациентов с депрессией.

Достоинства и недостатки модели удаления обонятельных луковиц (табл.).

Стресс для моделирования депрессии на животных

Стресс является основным этиологическим фактором риска возникновения депрессии [12]. По этим причинам многие модели депрессии пытаются воспроизвести некоторые основные компоненты депрессивного расстройства под воздействием острого, подострого или хронического стресса.

В водно-иммерсионной модели депрессии создается неконтролируемая или

неизбежная ситуация. Для этого крыс помещают в узкие пеналы, зафиксированные на общей платформе, которую ставят в ванну с водой так, чтобы крысы были погружены в нее до головы в положении на спине. В таком положении крысы остаются в прохладной воде (+16 °С) на протяжении 1 ч, после чего их тщательно высушивают и переносят в теплые жилые клетки. В условиях неизбежной ситуации только пассивные крысы формируют соответствующую посттравматическому стрессовому расстройству [6].

В качестве экспериментальной модели эндогенной депрессии используется парадигма «выученная беспомощность». В классических опытах при пропускании электрического тока через металлический пол остается «островок безопасности». В опытах М. Селигмана (1975) на первом этапе создавались условия, в которых у животного не было никакого пути спасения от регулярно повторяющихся ударов тока, в результате чего создавалась реакция капитуляции, отказа от безуспешных попыток избежать болезненного наказания. Более того, на втором этапе опыта, при помещении обученного подобным образом животного в новую обстановку, в которой имелся «островок спасения», оно не делало никаких попыток избавиться от наказания – срабатывал выработанный ранее стереотип пассивного реагирования. У животных в парадигме «выученная беспомощность» развивается устойчивое депрессивно-подобное состояние, характеризующееся двигательной ретардацией и повышенной тревожностью. Опыт неконтролируемых последствий у животных и людей закономерно приводит к пессимизму и депрессии, к снижению стремления предотвратить трудные

ситуации или активно овладевать ими [12]. Модель «выученной беспомощности» позволяет моделировать некоторые аспекты депрессии [19].

В модели хронического непредсказуемого стресса стресс создают ежедневными изменениями привычных условий существования: лишение корма, лишение воды, наклон клеток, инверсия светового режима, влажная подстилка, изоляция в течение 24-48 ч. Эффективность этой модели заключается в формировании поведенческих и физиологических изменений, которые имеют аналогию с симптомами депрессии – такие как повышение эмоциональности и тревожности, снижение самоконтроля и изменения в режиме сна, которые реагируют на лечение антидепрессантами [12].

Стресс раннего периода жизни является важным фактором, предрасполагающим к психопатологии у людей. У взрослых животных после стресса в раннем периоде жизни наблюдаются поведенческие отклонения, в том числе повышенная тревожность и страх, снижение двигательной активности, уменьшение социальной мотивации, снижение гедонистического ответа, сна и аппетита, эндокринные и нейрохимические изменения. Суть модели стресса раннего периода жизни заключается в отнятии детенышей от матери со 2-го по 15-й дни постнатального периода на 3 ч. в условия инкубатора. Эта модель депрессии особенно важна для понимания психологических проблем сирот, воспитываемых в среде с недостаточным уровнем стимуляции. Более поздние исследования психофизиологических реакций детенышей, отделенных от своих матерей, привели к пониманию поведенческих и социальных факторов, корректирующих и смягчающих напряженность и тревогу, вызван-

ную разлукой маленьких детей с их матерями [25, 27].

Социальный стресс представляет собой важный тип несчастья у многих видов и, как полагают, играет важную роль в развитии депрессии у человека. Для формирования депрессии у самцов мышей используется модель сенсорного контакта. Животных попарно помещают в экспериментальные клетки, разделенные пополам прозрачной перегородкой с отверстиями, позволяющей видеть, слышать, воспринимать запахи друг друга (сенсорный контакт), но предотвращавшей физическое взаимодействие. Ежедневно во второй половине дня (15.00-17.00) убирают перегородку, что приводит к межсамцовым конфронтациям. Во время первых 2-3 тестов выявляют победителей (агрессоров) и особей, терпящих поражения (побежденные, жертвы) при взаимодействии с одним и тем же партнером. В дальнейшем после теста побежденного самца пересаживают в новую клетку к незнакомому агрессивному партнеру, сидящему за перегородкой. Если интенсивные атаки со стороны нападающей особи во время агрессивных столкновений длились более 3-х мин., взаимодействие самцов прекращают, вновь устанавливая между ними перегородку. В экспериментальной модели социального поражения на грызунах используются конфликтная ситуация, в результате этого одно животное приобретает доминирующий статус, а другое, в конечном итоге, – побежденного [7, 12].

Следует отметить, что наиболее приближенными к проявлениям у людей являются модели стресса раннего периода жизни, социального поражения и хронического непредсказуемого стресса. Эти модели считаются более натуралистическими в индукции депрессивно-подобного состояния. Но, к сожалению, пока ни

Сравнительная характеристика моделей депрессии

Модель	Недостатки	Достоинства
Генетические модели депрессии	- активация компенсаторных механизмов при генетической манипуляции; - нокауты по некоторым генам не жизнеспособны; - не учитываются дополнительные факторы, определяющие формирование патогенеза депрессии	- позволяет исследовать значение отдельного гена; - влияние нокаута на поведение в общем совпадает с эффектами антагонистов; - позволяет выявить молекулярные механизмы действия препаратов и идентифицировать молекулы-мишени
Модель удаления обонятельной луковицы	- потеря обоняния, связанная с удалением обонятельных луковиц, не является основным фактором, влияющим на отклонения в поведении животного	- позволяет исследовать взаимосвязь между структурами лимбической системы и активностью антидепрессантов
Водно-иммерсионная модель	- может дать ложноположительные результаты препаратов, которые повышают двигательную активность и, соответственно, уменьшают неподвижность (например, амфетамин); - неравномерно различается острый от хронического эффект антидепрессантов	- позволяет исследовать действия антидепрессантов на продолжительность неподвижности крыс и мышей в зависимости от дозы
Модель выученной беспомощности	- низкая воспроизводимость и актуальность индукционных методов	- животные, которые беспомощны в этой модели, показывают некоторые особенности, которые имеют сходство с человеческой депрессии, в том числе снижение двигательной активности, потеря веса, нарушения сна, снижение мотивации, и увеличение стрессовых гормонов; - имеет хорошую прогностическую валидность; - позволяет исследовать эффективность антидепрессантов
Модель хронического непредсказуемого стресса	- прогностическая валидность усиливается по ходу времени; - общее отсутствие эффективности депрессантов	- более натуралистическая в индукции депрессивно-подобного состояния; - хорошая прогностическая валидность
Модель социального стресса	- чувствительна к длительному, а не к короткому лечению антидепрессантами	- более натуралистическая в индукции депрессивно-подобного состояния; - социальное поражение оказалось полезным для определения молекулярных механизмов, которые могут вызвать стабильные изменения в ЦНС; - животные могут быть идентифицированы как восприимчивые или устойчивые к воздействию социального поражения, указывающие дальнейшие значения социальных моделей поражения для исследования субстратов индивидуальной уязвимости
Модель стресса раннего периода жизни	- тревожно-депрессивные расстройства развиваются у взрослого животного	- более натуралистическая в индукции депрессивно-подобного состояния; - стабильность фенотипических изменений этой модели дает возможность изучить механизмы, включая экспрессию генов, связанных с расстройствами настроения; - важна для понимания психологических проблем сирот, воспитываемых в среде с недостаточным уровнем стимуляции

одна из моделей не повторяет депрессию, наблюдаемую у больных депрессий.

Фенотипирование экспериментальных животных с моделью депрессии

Оценка нейropsychического статуса экспериментальных животных является одним из основных подходов к подтверждению эффективности модели. Для оценки поведения животного при моделировании депрессии используются следующие тесты: «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», вынужденного плавания, подвешивания за хвост, гедонистической чувствительности и гипонеофагии.

Тест «открытое поле» заключается в исследовании двигательного компонента ориентировочной реакции и эмоциональной реактивности животных. Тест предназначен для изучения поведения грызунов в новых (стрессогенных) условиях. Животное помещают внутрь арены. Важно помнить, что поведение в первые 2-4 мин. связано с такими эмоциональными факторами как внезапность, необычность и новизна. Регистрируемые параметры: горизонтальная двигательная активность, вертикальная двигательная активность, груминг, обнюхивание/обследование отверстий, дефекация, моторные нарушения. «Эмоциональные» животные – высокий уровень дефекации и низкая подвижность, а «неэмоциональные» животные – низкий уровень дефекации и высокая подвижность. Показатели высокой тревожности: частые и длительные эпизоды замирания, низкая подвижность и редкие стойки, избегание центральной части арены, высокий уровень дефекации, длительный груминг [4].

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» является одним из общеприня-

тых тестов для оценки тревожного состояния особей. Поведение крыс исследуют в крестообразной установке, состоящей из двух открытых «рукавов» 50x10 см и двух закрытых «рукавов» 50x10 см, расположенных перпендикулярно друг другу. Высота над полом – 1 м. Животное помещают в центр лабиринта. Оцениваемые параметры: время пребывания в закрытых и открытых «рукавах»; количество заходов в закрытые и открытые «рукава»; длительность нахождения в центре, число переходов. Продолжительность теста составляет 3 мин. Тест позволяет оценить тревожность и параметры оценки риска; исследовательскую активность; эмоциональное состояние; двигательную активность [4].

Тест вынужденного плавания (Порсолта) отражает состояние депрессии. При тестировании крысы или мыши опускаются в металлический цилиндр, заполненный на две трети водой (температура +24°C). Длительность теста составляет 3 мин, в течение которых регистрируется поведение животных. Поведенческими показателями служат латентность первого «зависания», а также суммарное время неподвижности (иммобильности) и количество движений, направленных на освобождение от воды. Под иммобильностью подразумевается полное отсутствие плавательных движений при пассивном удержании животного на воде [12]. Тест подвешивания за хвост предназначен для изучения депрессивного поведения лабораторных животных. Мышь или крысу подвешивают за хвост на лейкопластыре, на расстоянии 1,5 см от кончика, а расстояние от пола до носа животного составляет 10 см. Оценивается латентный период иммобильности, суммарная иммобильность в течение 6 мин. Снижение длительности иммобильности у животных

опытных групп по сравнению с контролем расценивается как антидепрессивный эффект [12]. Этот тест получил широкое распространение в экспериментальной нейрофармакологии при разработке препаратов с антидепрессивным действием.

Тест гедонистической чувствительности. Потребление раствора сахарозы – показатель гедонистического поведения. Крысы, ранее привыкшие к сахарозе, как правило, отдадут предпочтение питьевой сахарозе по сравнению с водой в бутылке. Регистрируемые параметры: потребление раствора сахарозы и воды за сутки на грамм массы тела одного животного или на общую массу животных. Снижение потребления раствора сахарозы только в сумме с другими симптомами, характерными для этого психоэмоционального расстройства, может свидетельствовать о развитии депрессии у животных [7].

Тест гипонеофагии заключается в том, что животному дают новый корм в новой среде. Время регистрации 2-5 мин. Оценивают следующие показатели: латентный период взятия в лапы корма и количество съеденного корма. В качестве нового корма можно использовать орехи, сладкую кукурузу, тыквенные семечки и другие продукты. Животное после теста необходимо помещать в новую клетку, т.к. существует «социальная передача пищевых предпочтений». Этот тест хорошо реагирует на анксиолитические эффекты бензодиазепинов, барбитуратов и антидепрессантов [10, 12].

Разработка новых адекватных моделей депрессии и методов фенотипирования животных с этими моделями – важное направление современной нейробиологии, психиатрии и нейрофармакологии. От достижения успеха в этом направлении во многом зависит результативность исследований по изучению

молекулярного патогенеза депрессии и разработке новых эффективных методов ее терапии.

Работа выполнена при поддержке гранта в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (Соглашение № 8061, 2012-2013 гг.).

Список литературы

1. **Балукова Е.В.** Депрессия как фактор риска соматической патологии // Психиатрия. 2008. № 3. С. 36-43.
2. **Изнак А.Ф.** Нейрональная пластичность как один из аспектов патогенеза и терапии аффективных расстройств // Психиатрия и психофармакотерапия. 2005. Т. 7. № 1. С. 24-27.
3. **Оганов Р.Г., Погосова Г.В., Шальнова С.А., Деев А.Д.** Депрессивные расстройства в общей медицинской практике по данным исследования КОМПАС: взгляд кардиолога // Кардиология. 2005. № 8. С. 38-44.
4. **Самотруева М.А., Теплый Д.Л., Тюренков И.Н.** Экспериментальные модели поведения // Естественные науки. 2009. Т. 27. № 2. С. 140-152.
5. **Тювина Н.А.** Современные представления о патогенезе депрессии и подходы к антидепрессивной терапии (обзор литературы) // Психиатрия и психофармакотерапия. 2009. Т. 11. № 4. С. 35-38.
6. **Шалыпина В.Г., Вершинина Е.А., Ракицкая В.В., Рыжова Л.Ю., Семенова М.Г., Семенова О.Г.** Изменение приспособительного поведения активных и пассивных крыс Виста в водно-иммерсионной модели депрессии // Журнал высшей нервной деятельности. 2006. Т. 56. № 4. С. 543-547.
7. **Bondar N.P., Kovalenko I.L.,**

- Avgustinovich D.F., Kudryavtseva N.N.* Influence of experimental context on the development of anhedonia in male mice imposed to chronic social stress. // Zh. Vyssh. Nerv. Dei. Im. I. P. Pavlova. 2008. Vol. 58. № 2. P. 238-246.
8. *Canavello P.R., Egan R.J., Bergner C.L., Hart P.C., Cachat J.M., Kalueff A.V.* Genetic Animal Models of Depression // Neuromethods. 2009. Vol. 44. № 24. P. 191-200.
9. *Cotter D., Mackay D., Landau S.* Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder // Arch. Gen. Psychiatry. 2001. № 58. P. 545-553.
10. *Deacon Rob M.J.* Hyponeophagia: A Measure of Anxiety in the Mouse // Journal of Visualized. 2011. Vol. 51. P. 1-4.
11. *Drevets W.C., Price J.L., Bardgett M.E., et al.* Glucose metabolism in the amygdala in depression: relationship to diagnostic subtype and plasma Cortisol levels // Pharmacol. Biochem. Behav. 2002. Vol. 71. № 3. P. 431-447.
12. *Duman C.H.* Models of Depression // Vitamins and Hormones. 2010. Vol. 82. № 10. P.1-21.
13. *Duman R.S., Monteggia L.S.* A neurotrophic model for stress-related mood disorders // Biol. Psychiatry. 2006. Vol. 59. № 12. P. 1116-1127.
14. *Fuchs E., Eberhard Fuchs.* Clinical Neurobiology Laboratory, German Primate Center, Göttingen, Germany; Department of Neurology, Medical School, University of Göttingen, Germany; Flügge G.. Experimental animal models for the simulation of depression and anxiety // Dialogues Clin. Neurosci. 2006. Vol. 8. № 3. P. 323-333.
15. *Geyer M.A., Markou A., Bloom F.E., Kupfer D.J.* Animal models of psychiatric disorders // Psychopharmacology: the fourth generation of progress. 1995. P. 787-798.
16. *Hamidi M., Drevets W.C., Price J.L.* Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes // Biol. Psychiatry. 2004. № 55. P. 563-569.
17. *Hindmarch I.* Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods // Eur. Psychiatry. 2002. Vol. 17. P. 294-299.
18. *Hirschfeld R.M.* History and evolution of the monoamine hypothesis of depression // J. Clin. Psychiatry. 2000. Vol. 61. P. 4-6.
19. *Hitzemann R., Ph.D.* Animal Models of Psychiatric Disorders and Their Relevance to Alcoholism // Alcohol Research & Health. 2000. Vol. 24. № 3. P. 149-158.
20. *Jarosik J., Legutko B., Unsicker K., Halbach O.* Antidepressant-mediated reversal of abnormal behavior and neurodegeneration in mice following olfactory bulbectomy // Exp. Neurol. 2007. Vol. 204. № 1. P. 20-28.
21. *Jesberger J.A.* Animal models of depression: Parallels and correlates to severe depression in humans // Biological Psychiatry. 1985. Vol. 20. № 7. P. 764-784.
22. *Kasper S.* Neuroplasticity and the treatment of depression // Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2006. Vol. 2. P. 14-20.
23. *Lakhan S.E., Vieira K., Hamlat E.* Biomarkers in psychiatry: drawbacks and potential for misuse // International Archives of Medicine. 2010. Vol. 3. № 1. P. 1-6.
24. *Lohoff F.W.* Overview of the Genetics of Major Depressive Disorder // Curr. Psychiatry Rep. 2010. Vol. 12. № 6. P. 539-546.
25. *Marmendal M., Roman E., Peter Eriksson C. J., Nylander I., Fahlke C.* Maternal separation alters maternal care, but has minor effects on behavior and brain opioid peptides in adult offspring // Developmental Psychobiology. 2004. Vol. 45. № 3. P. 140-152.
26. *McEven B.S., Chattarji S.* Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine // Eur. Neuropsychopharmacol. 2004. Vol. 14. P. 497-502.
27. *McKinney W.T.* Overview of the past contributions of animal models and their changing place in psychiatry // Neuropsychiatry. 2001. Vol. 82. № 10. P. 68-78.
28. *Ongur D., Drevets W.C., Price J.L.* Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 13290-13295.
29. *Pajer K., Andrus B.M., Gardner W., Lourie A., Strange B., Campo J., Bridge J., Blizinsky K., Dennis K., Vedell P., Churchil G.A., Redei E.E.* Discovery of blood transcriptomic markers for depression in animal models and pilot validation in subjects with early-onset major depression // Transl. Psychiatry. 2012. Vol. 2. P. 2-10.
30. *Savitz J.B., Drevets W.C.* Imaging phenotypes of major depressive disorder: genetic correlates // Neuroscience. 2009. Vol. 164. № 1. P. 300-330.
31. *Schmidt H.D., Shelton R.C., Duman R.S.* Functional Biomarkers of Depression: Diagnosis, Treatment, and Pathophysiology // Neuropsychopharmacology. 2011. Vol. 36. P. 2375-2394.
32. *Sheline Y.I., Mittler B.L., Mintum M.A.* The hippocampus and depression // Eur. Psychiatry. 2002. Vol. 17. P. 300-305.
33. *Sheline Y.I., Sanghavi M., Mintum M.A., et al.* Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression // J. Neurosci. 1999. Vol. 19. P. 5034-5043.
34. *Zubenko G.S., Hughes H.B.* Replacement of homologous mouse DNA sequence with pathogenic 6-base human CREB1 promoter sequence creates murine model of major depressive disorder // Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet. 2011. Vol. 156. № 5. P. 517-531.

Current experimental models of depression

N.A. Yauzina, Yu.K. Komleva, A.B. Salmina, M.M. Petrova, G.A. Morozova, N.A. Malinovskaya, G.E. Gertsog

This review covers basic fundamental models of experimental modeling of depression and methods of experimental modeling of behavioral alterations. Animal models are promising enough for the understanding of psychopathology, but not as a deviations of behavior, as well as a series of psychological processes that obey certain laws. Creating models of depression is experiencing a period of prosperity. There are several models of depression: chronic mild stress model, social conflict model, learned helplessness model, water-immersion model. Many of them are based on some manipulation of the animals behavior, which have known biological effects. The investigation of the behavior of laboratory animals and modeling of depression allows detail characteristic features of psychopathology in humans.

Key words: depression, chronic mild stress, early-life stress model, social conflict model, learned helplessness model, water-immersion model.



Морфометрические показатели органов свободных от патогенной флоры крыс sd (sprague dawley) в норме

И.А. Дьяченко^{1,2}, Е.А. Калабина¹, С.Г. Семушина¹, И.А. Пахомова¹,
Г.А. Осипова¹, А.В. Лобанов^{1,2}, Э.Р. Шайхутдинова^{1,2}, Г.А. Слащева^{1,2},
Д.А. Бондаренко^{1,2}, В.В. Шерстнев³, Д.И. Ржевский^{1,2}, А.Н. Мурашев^{1,2}

¹ – Лаборатория биологических испытаний, филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пуццоно

² – Пуццинский государственный естественно-научный институт, Пуццоно

³ – Лаборатория функциональной нейрхимии, НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина

Контактная информация: Дьяченко Игорь Александрович, dyachenko@fibkh.serpukhov.su

Морфометрические показатели органов лабораторных животных, измеренные в разных лабораториях разными исследователями, существенно отличаются. По-видимому, эта разница обусловлена различными влияниями внешней среды и зависит от способа, момента и места взятия органов, пищевого режима, возраста животного и других факторов. Для получения достоверных и воспроизводимых результатов в исследованиях необходимы стандартные условия содержания животных, поэтому вопросам содержания экспериментальных животных в настоящее время уделяется очень большое внимание. Суммированы морфометрические показатели органов крыс SD (Sprague Dawley) категории СПФ (свободных от патогенной флоры), которые содержались в стандартных условиях, рекомендуемых для содержания лабораторных грызунов.

Ключевые слова: масса органов, крысы.

Введение

Крысы (*Rattus norvegicus*) достаточно часто используются в биомедицинских исследованиях (до 21% от общего числа используемых видов) [2, 4]. Они являются основным объектом доклинических испытаний для установления безопасности потенциальных лекарственных препаратов. Для оценки токсичности новых фармакологических препаратов необходимо комплексное исследование морфометрических показателей органов эксперимен-

тальных животных. Однако в справочной литературе имеется мало данных по морфометрии органов крыс, и разные авторы приводят различные величины [1, 2, 3, 5]. Кроме того, публикуемые в отечественной литературе данные, в основном, относятся к животным с неконтролируемым статусом (генетическим, микробиологическим), содержащимся в вивариях с большой вариацией условий содержания и параметров микроклимата. Однако в соответствии с международными и российскими правила-

ми проведения доклинических испытаний, экспериментальные животные должны быть обеспечены стандартными условиями содержания, быть здоровыми и обладать определенным генетическим и микробиологическим статусом [7, 8]. Использование лабораторных грызунов категории СПФ снижает варибельность изучаемых показателей и обеспечивает воспроизводимость и достоверность результатов.

Целью данной работы было обобщение результатов морфометрического исследования органов, выполненного в лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН во время проведения доклинических испытаний на крысах SD (Sprague Dawley) с 2009 по 2011 гг. для выведения референсных значений показателей массы органов здоровых животных.

Материалы и методы

Лаборатория имеет международную аккредитацию AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International), подтверждающую высокое качество работы с лабораторными животными. Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены Институтской комиссией по контролю над содержанием и ис-

пользованием лабораторных животных. Данные, включенные в эту публикацию, были получены на контрольных группах крыс SD (n = 80), участвовавших в исследованиях по выявлению субхронической токсичности или специфической активности различных препаратов. В статье представлены различные возрастные группы после введения в эксперимент (табл. 1).

В мировой практике аутбредные крысы SD (Sprague Dawley) наиболее часто используются в испытаниях общей токсичности веществ. Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» филиала Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и имели статус СПФ, подтверждаемый сертификатом производителя. В «Питомник лабораторных животных» ядра животных поступали из Charles River Laboratories (USA) в 2001 и 2006 гг. Все исследования проводились согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» [6] и стандартным операционным процедурам лаборатории. Контрольные животные получали растворитель согласно способу и режиму введения исследуемых веществ опытным животным: внутривенные инъекции физиологического раствора в хвостовую вену,

Таблица 1
Возрастные группы экспериментальных животных, подвергнутых морфометрическому анализу

Самцы CD			Самки CD		
Возраст (неделя)	Масса животных (г)	Количество животных (n)	Возраст (неделя)	Масса животных (г)	Количество животных (n)
6	210,2±8,2	5	6	159,0±2,9	5
8	307,4±8,6	5	8	176,2±5,9	5
10-13	363,5±9,6	20	9-11	210,5±4,9	20
14-16	396,0±10,6	20	12-15	235,5±3,6	20
17-19	527,6±27,7	15	16-19	258,0±14,1	15
20-22	550,8±17,5	15	20-22	275±12,0	15

Таблица 2

Показатели массы органов самцов крыс SD относительно массы тела (%)

Органы	6 недель	8 недель	10-13 недель	14-16 недель	17-19 недель	20-22 недель
Масса животных (г)	210,2±8,2	307,4±8,6*#	363,5±9,6*#	396,0±10,6*#	527,6±27,7*	550,8±17,5*
Семенники, %	1,15±0,04	0,98±0,06*#	0,89±0,02*	0,81±0,01*#	0,69±0,03*#	0,65±0,04*
Селезенка, %	0,30±0,02	0,21±0,02*#	0,20±0,01*	0,19±0,01*	0,18±0,01*	0,16±0,01*
Почки, %	1,4±0,01	1,00±0,03*#	0,85±0,02*#	0,76±0,01*#	0,78±0,05*	0,76±0,04*
Надпочечники, %	0,026±0,001	0,018±0,001*#	0,019±0,001*	0,015±0,001*#	0,013±0,001*#	0,011±0,001*
Печень, %	3,97±0,08	3,73±0,11	3,58±0,06*	3,38±0,07*#	3,08±0,10*#	3,09±0,09*
Тимус, %	0,38±0,02	0,18±0,01*#	0,22±0,03*	0,09±0,01*#	0,06±0,01*#	0,05±0,01*
Сердце, %	0,43±0,01	0,37±0,01*#	0,37±0,01*	0,32±0,01*#	0,31±0,01*	0,28±0,02*
Головной мозг, %	0,91±0,34	0,65±0,02*#	0,57±0,01*#	0,49±0,03*#	0,42±0,02*	0,40±0,02*

* – P<0,05 относительно группы «6 недель»; # – P<0,05 относительно предыдущей возрастной группы.

или питьевую воду зондом в желудок. Животных содержали в комнатах барьерного типа с контролируемыми условиями окружающей среды: температура 18-26°C, относительная влажность воздуха 30-70%, автоматическая смена 12-часового светового периода, 100% вентиляция. Условия содержания соответствуют стандартам, указанным в руководстве The Guide for Care and Use of Laboratory Animals [7]. Животные содержались в поликарбонатных клетках, в качестве подстилки использовался беспылевой подстил для грызунов (LIGNOCEL, Germany), представляющий собой древесную крошку. Животные получали автоклавированный стандартный экструдированный корм Агро-1 («Ассортиментагро», Россия) и профильтрованную водопроводную воду. Во время исследований животных содержали по 5 особей в клетке площадью 1815 см². Животных лишали корма на ночь перед некропсией, оставляя свободный доступ к воде. Массу тела определяли непосредственно перед некропсией. Взвешивание органов проводили на платформенных весах с диапазоном измерения 0-210 г и точностью 0,0001

г. Парные органы взвешивали вместе, перед взвешиванием органы очищали от адипозной и соединительной ткани. Рассчитывали процентное отношение массы органа к массе тела, определенной непосредственно перед некропсией, а также к массе мозга.

Для всех данных была применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение (Mean) и стандартная ошибка среднего (SEM), которые вместе со значением n представлены в итоговых таблицах. Данные по экспериментальным животным суммировали согласно возрастным категориям. Для определения достоверности отличий между возрастными группами применялся тест Mann-Whitney. Статистический анализ проводился программой Statistica – 7.0.

Результаты и их обсуждение

Полученные данные о массе органов крыс в возрасте от 6 до 22 недель демонстрируют динамику показателей относительно массы тела и массы головного мозга с возрастом животных. Относительно массы тела у самцов наблюдалось

Таблица 3

Показатели массы органов самок крыс SD относительно массы тела (%)

Органы	6 недель	8 недель	9-11 недель	12-15 недель	16-19 недель	20-22 недель
Масса животных (г)	159,0±0,9	176,2±2,9*#	210,2±4,9*#	235,5±3,6*#	258,0±14,1*	275,0±12,0*
Яичники, %	0,071±0,004	0,071±0,004	0,056±0,001*#	0,051±0,002*#	0,046±0,003*	0,047±0,003*
Селезенка, %	0,26±0,03	0,21±0,01	0,24±0,01	0,23±0,01	0,21±0,02	0,20±0,01*
Почки, %	1,12±0,02	1,05±0,04	0,86±0,20*#	0,80±0,02*#	0,75±0,04*	0,76±0,01*
Надпочечники, %	0,035±0,002	0,038±0,001	0,033±0,001#	0,031±0,001	0,028±0,002*	0,029±0,001*
Печень, %	3,95±0,10	3,58±0,08*#	3,40±0,07*	3,28±0,06*	2,94±0,09*#	3,10±0,07*
Тимус, %	0,36±0,03	0,23±0,01*#	0,22±0,02*	0,25±0,04*	0,09±0,01*#	0,08±0,01*
Сердце, %	0,44±0,02	0,44±0,01	0,40±0,01#	0,42±0,20	0,37±0,02*	0,35±0,01*
Головной мозг, %	1,13±0,03	1,07±0,04	0,92±0,03*#	0,82±0,02*#	0,75±0,04*	0,71±0,03*

* – P<0,05 относительно группы «6 недель»; # – P<0,05 относительно предыдущей возрастной группы.

постепенное снижение массы всех исследованных органов, что было связано с постоянным увеличением массы тела животных (табл. 2). Аналогичная тенденция наблюдалась и у самок, за исключением селезенки и надпочечников, относительная масса которых оставалась практически неизменной на протяжении всего срока наблюдения (табл. 3). Интересно, что к 19-недельному возрасту относительная масса таких органов как почки, сердце и головной мозг (а также яичники у самок) перестает снижаться по сравнению с предыдущей возрастной группой, а к 22-неделе стабилизируется масса всех органов.

При расчете значений массы органов относительно массы головного мозга (табл. 3, 4) было установлено, что часть параметров обладают отрицательной динамикой по аналогии с расчетом значений относительно массы тела, тогда как другие параметры обладают положительной динамикой или остаются стабильными на протяжении всей жизни. Это связано с тем, что масса головного мозга является более стабильным показателем, чем масса тела, и мало изменяется с возрастом. Так,

наблюдалось постепенное увеличение с возрастом животных относительной массы семенников у самцов, причем наиболее интенсивный прирост наблюдался в период с 6-ой по 8-ую неделю, что связано с периодом полового созревания. Интересно, что у самок относительная масса яичников не продемонстрировала явного прироста и была стабильна на протяжении всего периода наблюдения, что может быть связано с более ранним половым созреванием у самок (до 6-недельного возраста). Помимо половых желез, прирост относительной массы наблюдался в печени и сердце. Почки продемонстрировали различный характер динамики в зависимости от пола. У самок относительная масса почек практически не изменялась с возрастом, тогда как у самцов был явно выражен прирост их массы, особенно с 17-ой по 22-ую неделю жизни. Явная отрицательная динамика, по аналогии с расчетом относительной массы тела, наблюдалась у тимуса, что связано с его инволюцией с возрастом.

В итоге, к 22-ой неделе жизни животных процентное отношение массы практически всех органов к массе мозга у самцов

Таблица 4

Показатели массы органов самцов крыс SD относительно массы мозга (%)

Органы	6 недель	8 недель	10-13 недель	14-16 недель	17-19 недель	20-22 недель
Масса мозга (г)	1,96±0,03	1,99±0,03	2,06±0,03*	2,04±0,04*	2,20±0,02*#	2,19±0,04*
Семенники, %	127,1±4,8	150,6±8,5*#	151,4±3,3*	157,0±5,0*	165,2±6,7*	164,0±7,5*
Селезенка, %	33,62±2,37	31,84±1,87	34,67±1,27	35,96±1,56	43,22±3,75*	39,50±1,15*
Почки, %	125,7±5,6	154,3±8,4*#	146,2±4,5*	147,8±6,5*	186,2±14,0*#	191,0±6,0*
Надпочечники, %	2,86±0,13	2,79±0,07	3,30±0,11*#	2,93±0,16	3,08±0,10	2,76±0,22
Печень, %	436,9±20,2	576,1±2,5*#	613,2±15,6*	659,7±33,1*	738,9±39,9*	778,9±31,2*
Тимус, %	42,05±3,46	27,82±1,81*#	39,18±5,36	18,44±2,17*#	14,06±2,07*	13,06±1,18*
Сердце, %	47,69±2,81	56,46±1,13*#	63,04±2,28*#	62,89±2,53*	74,05±2,16*#	70,35±3,52*

* – P<0,05 относительно группы «6 недель»; # – P<0,05 относительно предыдущей возрастной группы.

было выше, чем у самок, что коррелирует с большей массой тела у самцов. Исключение составили надпочечники, относительная масса которых была выше у самок.

Выводы

Получены ориентировочные величины показателей морфометрии органов здоровых животных аутобредных крыс SD категории СПФ, содержащихся в стандартных условиях. Выявлены отличия показателей массы органов у животных разных возрастных групп и разного пола, что важно учитывать при оценке результатов каждого конкретного исследования. Сопоставление данных по массе органов в относительных значениях от массы тела и от массы головного мозга позволило сделать предположение о том, что в исследованиях, в которых используются разные возрастные группы животных, или анализ массы органов производится на разных этапах жизни животных, целесообразно использовать расчет процентного отношения массы органов к массе головного мозга. Если же исследованию подвергаются животные одной возрастной группы, а также в случае проведения сравнения между животными

разного пола, более рационально использовать расчет процентного отношения массы органов к массе тела животного. Морфометрические данные, приведенные в настоящей статье, помогут исследователям разных лабораторий правильно интерпретировать результаты своих работ.

Работа выполнена в рамках проекта «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. по государственному контракту № 02.740.11.0773 и ДОГОВОР № 103 от «02» мая 2012 г.

Список литературы

1. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. – М. 2003.
2. Дьяченко И.А. Сравнительный анализ нейротоксического действия изоформ зернамицина из гриба *Emergeliopsis salmosinematata*, Токсикологический вестник. 2010. № 2 (101). С. 48-52.
3. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. М.: Изд-во ВПК, 2004.
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от

Таблица 5

Показатели массы органов самок крыс SD относительно массы мозга (%)

Органы	6 недель	8 недель	9-11 недель	12-15 недель	16-19 недель	20-22 недель
Масса мозга (г)	1,79±0,03	1,88±0,03	1,93±0,02*	1,93±0,02*	1,92±0,02*	1,93±0,02*
Яичники, %	6,33±0,39	6,60±0,20	6,15±0,19	6,18±0,21	6,07±0,12	6,73±0,37
Селезенка, %	23,02±2,34	20,00±0,73	25,85±0,87#	28,13±0,89	27,68±2,14	28,92±1,70
Почки, %	99,49±1,58	98,33±2,32	94,05±2,38*	97,75±2,77	100,72±5,35	108,57±4,74
Надпочечники, %	3,10±0,14	3,53±0,11*#	3,62±0,13*	3,81±0,10*	3,75±0,17*	4,12±0,25*
Печень, %	351,3±14,5	335,8±10,4	371,6±11,6#	401,2±8,3*#	393,1±16,5	439,9±14,1*
Тимус, %	32,22±2,59	22,06±1,18*#	23,43±1,99*	30,42±4,46	11,99±0,83*#	10,77±0,68*
Сердце, %	39,04±2,54	41,25±0,80	43,39±0,92	51,61±2,00*#	48,97±1,96*	49,62±2,45*

* – P<0,05 относительно группы «6 недель»; # – P<0,05 относительно предыдущей возрастной группы.

19.06.2003 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации».

5. Мурашев А.Н., Хохлова О.Н., Ржевский Д.И., Жармухамедова Т.Ю. Принципы организации и проведения доклинических (фармакологических) исследований в соответствии с международными стандартами. М.: ИРДПО. 2008. ISBN 978-5-903465-05-7. 90 с.
6. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М. 2005.
7. Жармухамедова Т.Ю., Хохлова

О.Н., Гуськова Т.А., Ржевский Д.И., Мурашев А.Н. Обязанности руководителя исследования при проведении испытаний безопасности химических веществ, биотехнологических и нанотехнологических продуктов в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики // Токсикологический вестник. 2009. № 5. С. 2-4.

8. Бондаренко Д.А., Дьяченко И.А., Скобцов Д.И., Мурашев А.Н. IN VIVO модели для изучения анальгетической активности // Биомедицина. № 2. 2011. С. 84-95.

Morphometric characters of normal specific pathogen-free sd (sprague dawley) rats

I.A. Dyachenko, E.A. Kalabina, S.G. Semushina, I.A. Pakhomova, G.A. Osipova, A.V. Lobanov, D.I. Rzhovsky, V.V. Sherstnev, A.N. Murashev

Morphometric characters of laboratory animals measured in different laboratories by different investigators are varied essentially. Apparently, this difference is caused by various influences of environment, depends on the way, moment and a place of blood sampling, dietary, animal age and some other factors. Standard conditions of animal's maintenance are necessary for valid and reproducible research data therefore much attention now is given to the experimental animals care and use. This paper summarizes morphometric characters of SD (Sprague Dawley) rats mice which had SPF status (specific pathogen free) and were housed in standard conditions recommended for laboratory rodents maintenance.

Key words: organ weight, rats.

Межлинейные различия в чувствительности к острой гипобарической гипоксии у инбредных мышей коллекционного фонда

Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко, Л.Х. Казакова, Т.Б. Бескова,
З.С. Лушникова, И.Ю. Егорова, Е.Л. Матвеевко

ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России»

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

Проведенное исследование показало, что мыши различных генотипов обладают разной устойчивостью к острой гипобарической гипоксии. По чувствительности к острой гипоксии исследуемые генотипы можно условно разделить на 3 категории: низкоустойчивые – IOR/HabY, CC57WY, CBA/LacY, 101/HY; среднеустойчивые – C3HAY, CBA/JY и высокоустойчивые – A/SnY, B10CWY, C57BL/6Y, DBA/2Y. Различия между высоко- и низкоустойчивыми к гипоксии генотипами статистически достоверны ($p > 0,001$). Следует указать, что инбредный возраст при этом не оказывает никакого влияния на исследуемый признак. Об этом свидетельствует тот факт, что мыши самой высокоинбредной линии CBA/JY, прошедшие 251 поколение инбридинга, заняли среднее положение между низко- и высокоустойчивыми генотипами. Согласно полученным результатам, исследуемый признак обладает высокой вариабельностью как между животными разных линий, так и между особями внутри каждой линии. Высокая вариабельность в чувствительности к острой гипоксии у животных одного генотипа свидетельствует об отсутствии селекции по данному признаку. Различия между самками и самцами внутри линий недостоверны. Исключение составили мыши линии CBA/LacY, у которых самцы по чувствительности к острой гипоксии достоверно превосходили самок.

Ключевые слова: инбредные линии, острая гипобарическая гипоксия, генотип, фенотип, селекция.

Выведение инбредных линий лабораторных животных, начатое в XX веке генетиками и онкологами, создало предпосылки для перехода биомедицинских исследований на качественно более высокий уровень. Широкое использование инбредных линий практически во всех областях биологии и экспериментальной медицины обусловлено их уникальной особенностью и достоинством – все животные в пределах линии гомозиготны и генетически однородны. Это обеспечивает воспроизводимость результатов, повышает эффективность и надежность медико-биологических исследований, проводимых с их использованием [2].

В изучении важнейшей проблемы медицины – гипоксии (явления, которое,

согласно современным представлениям, включается в патогенез практически любого заболевания) – широко используются лабораторные животные (главным образом, крысы). Начиная с 70-х гг. прошлого столетия, в литературе появляется большое количество публикаций, посвященных индивидуальной чувствительности к гипоксии [1]. Установлено, что в любой популяции неинбредных животных особи значительно различаются между собой по индивидуальной резистентности к острой гипоксии. Напротив, различия в чувствительности к острой гипобарической гипоксии между отдельными особями в инбредных линиях существенно меньше, чем среди неинбредных животных [3, 4]. Однако до сих пор почти

Показатели индивидуальной чувствительности к острой гипобарической гипоксии у мышей инбредных линий

	CBA/Lac	CC57W	101/H	Ior/Hab	C3HА	CBA/J	A/Sn	DBA/2	B10CW	C57BL/6
Инбредный возраст	F183	F170	F103	F115	F170	F251	F152	F191	F93	F180
Самцы										
M±m	156,1±17,29	93,5±7,78	109,0±10,48	5,58	143,2±4,23	117,5±9,95	206,5±13,87	374,5±22,39	193,0±8,89	282,2±13,42
Коэффициент вариации, %	35,0	26,3	30,4	21,2	9,3	26,8	21,2	18,9	14,6	15,0
Самки										
M±m	67,5±4,17	92,0±7,08	116,5±7,27	97,5±8,70	100,0±7,53	140,3±8,10	221,5±9,78	385,5±17,71	250,5±10,45	283,0±12,72
Коэффициент вариации, %	19,5	24,3	19,7	28,2	23,8	18,3	14,0	14,5	13,2	14,2
В целом по линии										
M±m	111,8±13,35	92,75±5,12	112,8±6,27	90,5±5,28	121,6±6,50	128,9±6,77	214,0±8,43	380,0±13,95	221,8±9,38	282,6±9,00
Коэффициент вариации, %	53,4	24,7	24,9	26,1	23,9	23,5	17,6	16,4	18,9	14,2

нет исследований, посвященных изучению этого вопроса у инбредных мышей.

Цель настоящей работы – изучить индивидуальную чувствительность мышей инбредных линий к острой гипобарической гипоксии.

Материалы и методы

Работа выполнена на мышах двухмесячного возраста из инбредных линий CBA/LacY, CC57WY, 101/HY, IOR/HabY, C3HAY, CBA/JY, A/SnY, DBA/2Y, B10CWY, C57BL/6Y, поддерживаемых в коллекционном фонде НЦБМТ. Мыши содержались в конвекционных условиях, в пластмассовых клетках фирмы «Velaz» с автопоилками. В качестве подстилочного материала использовали древесные опилки. Кормление животных осуществляли гранулированным комбикормом производства ООО «Лабораторкорм» ad libitum. Дополнительно к нему один раз в неделю мыши получали витаминно-белковую подкормку, в состав которой вхо-

дят овсянка, сухое молоко, витамины А, Е, D в масле.

Для оценки индивидуальной чувствительности к острой гипобарической гипоксии каждая мышь в барокамере «поднимается на критическую (для мышей) высоту» (10 тыс. м) со скоростью 165 м/сек, где она находится до агонального состояния. Исследуемые показатели: ВПП – время первого падения (переход в лежачее положение), характеризующее порог реакции организма на данное воздействие, сек; ВЖ – время жизни «на высоте» (до появления агонального дыхания), сек; ВВП – время восстановления позы после спуска животного с «высоты», сек.

Мерой оценки чувствительности животного к острой гипобарической гипоксии служит время жизни на «высоте». Результаты обработаны статистически на ПК с использованием t-критерия Стьюдента и стандартной программы Statistica-6.

Таблица 2

Сравнительные показатели меж- и внутрилинейных (по полу) различий по чувствительности к острой гипоксии у инбредных мышей

Показатель	Инбредные линии мышей						
	СВА/Лас самцы	СВА/Лас самки	СВА/Ј самцы	А/Sn самцы	DBA/2 самцы	В10СW самцы	С57BL/6 самцы
М±m	156,1±17,29	67,5±4,17	117,5±9,95	206,5±13,86	374,5±22,39	193,0±8,89	282,2±13,42
Достоверность различия средних	-	***	не достоверно	*	***	-	***
Кoeffициент вариации, %	35,0	19,5	26,8	21,2	18,9	14,6	15,0
М±m	67,5±4,17	140,3±8,10	221,5±9,78	385,5±17,71	250,5±10,45	283,0±12,72	
Достоверность различия средних	-	***	***	***	***	***	
Кoeffициент вариации, %	19,5	18,3	14,0	14,5	13,2	14,2	
М±m	93,5±7,78	92,0±7,08	117,5±9,95	206,5±13,87	374,5±22,39	193,0±8,89	282,2±13,42
Достоверность различия средних	-	не достоверно	**	***	***	***	***
Кoeffициент вариации, %	26,3	24,3	26,8	21,2	18,9	14,6	15,0
М±m	92,0±7,08	140,3±8,10	221,5±9,78	385,5±17,71	250,5±10,45	283,0±12,72	
Достоверность различия средних	-	***	***	***	***	***	
Кoeffициент вариации, %	24,3	18,3	14,0	14,5	13,2	14,2	
М±m	109,0±10,48	116,5±7,27	117,5±9,95	206,5±13,86	374,5±22,39	193,0±8,89	282,2±13,42
Достоверность различия средних	-	не достоверно	не достоверно	***	***	***	***
Кoeffициент вариации, %	30,4	19,7	26,8	21,2	18,9	14,6	15,0
М±m	116,5±7,27	140,3±8,10	221,5±9,78	385,5±17,71	250,5±10,45	283,0±12,72	
Достоверность различия средних	-	*	***	***	***	***	
Кoeffициент вариации, %	19,7	18,3	14,0	14,5	13,2	14,2	
М±m	83,5±5,58	97,5±8,70	117,5±9,95	206,5±13,86	374,5±22,39	193,0±8,89	282,2±13,42
Достоверность различия средних	-	-	**	***	***	***	***
Кoeffициент вариации, %	21,2	28,2	26,8	21,2	18,9	14,6	15,0
М±m	97,5±8,70	140,3±8,10	221,5±9,78	385,5±17,71	250,5±10,45	283,0±12,72	
Достоверность различия средних	-	**	***	***	***	***	
Кoeffициент вариации, %	28,2	18,3	14,0	14,5	13,2	14,2	
М±m	143,2±4,23	100,0±7,53	117,5±9,95	206,5±13,86	374,5±22,39	193,0±8,89	282,2±13,42
Достоверность различия средних	-	***	*	***	***	***	***
Кoeffициент вариации, %	9,3	23,8	26,8	21,2	18,9	14,6	15,0
М±m	100,0±7,53	140,3±8,10	221,5±9,78	385,5±17,71	250,5±10,45	283,0±12,72	
Достоверность различия средних	-	**	***	***	***	***	
Кoeffициент вариации, %	23,8	18,3	14,0	14,5	13,2	14,2	
М±m	111,8±13,35	128,9±6,77	214,0±8,43	380,0±13,95	221,8±9,38	282,6±9,00	
Достоверность различия средних	-	-	***	***	***	***	
Кoeffициент вариации, %	53,4	23,5	17,6	16,4	18,9	14,2	

Примечание: * – достоверно при p>0,1; ** – достоверно при p>0,05; *** – достоверно при p>0,001.

Результаты исследований

Показатели уровня индивидуальной чувствительности к острой гипобарической гипоксии у мышей различных линий представлены в табл. 1. Совершенно очевидно, что мыши разных генотипов обладают разным фенотипом устойчивости к острой гипоксии. Полученные данные показали, что по чувствительности к острой гипоксии исследованные генотипы могут быть разделены на три категории: низкоустойчивые – IOR/HabY, CC57WY, СВА/ЛасY, 101/НУ; среднеустойчивые – СЗНАY, СВА/ЈY и высокоустойчивые – А/SnY, В10СWY, С57BL/6Y, DBA/2Y. При этом следует отметить, что инбредный возраст животных не оказал никакого влияния на изучаемый признак. Так, самая высокоинбредная линия СВА/ЈY, которая прошла 251 поколение инбридинга (F251), заняла промежуточное положение по резистентности к острой гипоксии между оппозитными линиями. Результаты исследований свидетельствуют также о высокой вариабельности этого показателя как между животными разных линий, так и между особями внутри одной линии. Межлинейная разница в чувствительности к острой гипоксии составила, в среднем, 230-250%. Вариация по устойчивости к острой гипоксии у особей внутри каждой линии составила, в среднем, 140-160%, что значительно ниже, чем межлинейное ее значение. Высокая вариабельность между животными одной линии свидетельствует об отсутствии селекции у мышей по данному признаку. Следует также указать, что по времени жизни на «высоте» мыши генотипа DBA/2Y превосходили своих аналогов из линии IOR/HabY в 4,2 раза (420%).

Кроме того, были проведены исследования по выявлению различий в чувствительности к острой гипоксии

между самками и самцами внутри каждой линии (табл. 2). Согласно полученным результатам, только у мышей линии СВА/ЛасY самцы статистически достоверно (p>0,001) превзошли своих самок по изучаемому признаку. Различия по жизнеспособности на «высоте» между самками и самцами у всех остальных линий не достоверны.

Что касается различий по устойчивости к острой гипоксии между самками и самцами оппозитных генотипов, то следует отметить, что как самки, так и самцы резистентных линий, исключая В10СWY, достоверно превосходили своих однополых аналогов из низкоустойчивых линий. Различия по исследуемому признаку только между самцами генотипов В10СWY и СВА/ЛасY были не достоверны.

Выводы

Проведенное исследование показало, что мыши различных генотипов обладают разной устойчивостью к острой гипобарической гипоксии.

Инбредный возраст не оказывает влияния на данный признак. Различия между высоко- и низкоустойчивыми к гипоксии генотипами статистически достоверны (p>0,001).

Исследуемый признак обладает высокой вариабельностью как между животными разных линий, так и между особями внутри каждой линии.

Высокая вариабельность в чувствительности к острой гипоксии у животных одного генотипа свидетельствует об отсутствии селекции по данному признаку.

Различия между самками и самцами внутри линий не достоверны. Исключение составили мыши линии СВА/ЛасY, у которых самцы по чувствительности к острой гипоксии достоверно превосходили самок.

Список литературы

1. **Березовский В.А.** Гипоксия. – Киев: Наукова думка. 1978.
2. **Бландова З.К., Душкин В.А., Машащенко А.М., Шмидт Е.Ф.** Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – М.: Наука. 1983.
3. **Богомолов В.И., Лукьянова Л.Д.** Бюлл. эксп. биологии и медицины. 1992. Т.114. № 2. С. 657-659.
4. Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты/ под ред. Лукьяновой Л.Д., Ушакова И.Б. – М. Воронеж: Истоки. 2004.

Interlinear distinctions in sensitivity to a sharp hypobaric hypoxia at inbred mice of collection fund

Kh.Kh. Semenov, N.N. Karkischenko, L.Kh. Kazakova, T.B. Beskova,
Z.S. Lushnikova, I.Yu. Egorova, E.L. Matveyenko

The conducted research showed that mice of various genotypes possess different resistance to a sharp hypobaric hypoxia. On sensitivity to a sharp hypoxia studied genotypes can be divided into 3 categories conditionally: the low-steady – IOR/HabY, CC57WY, CBA/LacY, 101/HY; middle-steady – C3HAY, CBA/JY and high-steady – A/SnY, B10CWY, C57BL/6Y, DBA/2Y. Distinction between highly and low-steady against a hypoxia are statistically reliable ($p > 0,001$). It is necessary to specify that inbred age thus has no impact on this sign. That fact testifies to it that the mice of the most highly inbred CBA/JY line who have passed 251 inbred generations, reached average position between low and high-steady genotypes. According to the received results, the studied sign possesses high variability both between animals of different lines, and between individuals in each line. High variability in sensitivity to a sharp hypoxia at animals of one genotype testifies to lack of selection on this sign. Distinctions between females and males in lines are doubtful. The exception was made by mice of the CBA/LacY line at whom males to a sharp hypoxia authentically surpassed females in sensitivity.

Key words: inbred lines, sharp hypobaric hypoxia, genotype, phenotype, selection.



МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Enhanced technologies and integration parameters of pre-clinical studies

L. Bachdasarian¹, R. Bulthuis¹, E. Molewijk¹, S. Guchkov², A. Revyakin³

¹ – *Metris B.V., The Netherlands, 2132 NG Hoofddorp, Kruisweg 825*

² – *University of Orel, Orel, Russia*

³ – *Federal State Budgetary Institution Scientific center of biomedical technologies of Federal Medical and Biological Agency, Moscow region, Russia*

Correspondence: Dr. Levon Bachdasarian, levon@metris.nl

When the drug penetrates into the organism, a biochemical reaction takes place and one can say the latter produces energetic changes in the organisms of the laboratory animals. The drug penetrating into the organism changes the potential energy of the body; the latter after some time brings to changes in kinetic energy which is expressed in people and in animals as changes in behaviour. This means that energy is the most important parameter in all stages beginning from molecular biology to preclinical research.

Laboras system by Metris B.V. enables measurement of all types of kinetic energy while other non-invasive automated systems for behavior detection can only measure the locomotion component of the kinetic energy (e.g. locomotion energy $mv^2/2$). In addition the matrix method and technology used in Laboras provides a way to measure more behaviors and to recognize them completely automatic and more precisely than ever before.

For the properly the build your study is better integrate behavioral analysis with telemetry analysis.

In this case you make the matrix of statistical parameters bigger and stable for 24 hour animal study.

Laboras system can integrate with DSI telemetry system and in the same result summary analyze Physiological and behavioral parameters.

For ultrasounds vocalization study use Sonotrack system and integrate with Laboras results.

Key words: preclinical research, Laboras system, behavioral parameters, energy.

Preface

When I got engaged in the algorithm building for automated detection of behaviours, it was obvious for me that the matter is random signal (in this case animal behaviour). Logically I asked the most important question of how can I find generalities in the same behaviour at different points of time. It was necessary to understand thoroughly the concept in order to create the mathematical model, and then build an algorithm which will

detect the behaviour. I have arrived at an interesting conclusion after extensive statistics tabulation and analysis of Laboras signals as well as after the studies of the behaviours of rats and mice. I have studied the entire process of drug development; this helped me to find out the important links between the stages of drug production. The new algorithm for the automated behaviour detection by Laboras system assumes great responsibility for us. Laboras system is used in drug development studies. Then

these new drugs are put on the market all of us are using those drugs. The effectiveness of the drug greatly depends on the success of equipments and experiment results.

The main stages of drug production are:

- Molecular biology;
- Biological systems (cells, reticulum);
- Preclinical research;
- Clinical research.

When the drug penetrates into the organism, a biochemical reaction takes place and one can say the latter produces energetic changes in the organisms of the laboratory animals. The drug penetrating into the organism changes the potential energy of the body; the latter after some time brings to changes in kinetic energy which is expressed in people and in animals as changes in behaviour. This means that energy is the most important parameter in all stages beginning from molecular biology to preclinical research. After thorough studies of all stages it is possible to come to the conclusion which was proved by the statistics and analysis of algorithm for Laboras system that energy or any variable depending upon is of great interest in all stages. And researchers can achieve success only through a team work. Medical science is not to be viewed as a separate science: medical science can be generalized with all natural sciences. Therefore in drug production we have to do with many branches of science such as molecular biology, biochemistry, physiologic chemistry, biological systems, biology, chemistry, physics, nuclear and atomic physics, mechanics, thermodynamics, mathematics and IT. So the development and production of new drugs will achieve great results if [11, 12].

- The problem is solved through teamwork involving specialists from different branches of science.

- Precision tools are used in all stages of development.
- Precise definitions are given in all stages.
- Different parameters are to be defined accurately, the group of which will yield in high results.
- All testing stages are implemented completely and minimum testing criteria are defined.

History

Adam P. Arkin [13], an assistant professor of chemistry and bioengineering at the University of California considers computation to be the practical application of theory, but he believes that experimental data are necessary to keep theory realistic. “The thing about theory and computation is very compelling until an experiment is done,” he says. “A theorist who is constantly generating theory without experimental feedback is in danger of migrating away from reality, especially in biology and pharmacology.” Christophe H. Schilling [13], vice president and chief technology officer at that they are Genomatica [13] in San Diego also believes that a combination of computation and experiment is vital. “If you generate a model in a vacuum and don’t make a prediction that you can then test, you don’t know if a model is right or wrong,” he says. “If you generate data without a hypothesis, in some respects you can prove anything you want. Mathematical models, if you do them right, become hypotheses that are testable.” For properly the build a new model, you need right definitions. Schneider advocates borrowing methods from engineers, particularly from electrical and chemical engineering. “The key is the unit-operation approach. You have to define the physiological unit operations,” he says. “On a fundamental basis, there’s really nothing different

between unit operations for resistors, capacitors, and induction coils than for Michaelis-Menten kinetics, membrane transport, and chemical equilibria. They’re just equations that apply. Because of its many facets, Drugs development attracts scientists from a variety of disciplines, including the basic sciences, engineering, and computer science. Leroy E. Hood [13], cofounder and president of the Seattle-based Institute for Systems Biology sees the field as needing “the integration of a cross-disciplinary group of scientists working together.” In fact, he believes that future scientists will have to become familiar with multiple subjects. “All biologists should really think in terms of two subjects,” Hood says. “If you’re a biologist, you should also think about computer science or applied mathematics or engineering. I think everybody ought to learn biology, plus either a quantitative computational skill or a physical skill. I’m very much attracted to a dual mentorship idea. Arkin’s group [13], which includes 33 people from 12 departments and five institutions, exemplifies the multidisciplinary nature of systems biology. “They’re very diverse, and they’re forced to hang out together,” he says. “For four to six years, they’re in a laboratory in which there are people who are mechanical engineers, bioengineers, chemical engineers, physicists, biologists, mathematicians, statisticians. They learn the language, but each one is trained in his or her own department”. AstraZeneca’s Fickett points out [13] that most of what is known about protein interactions is contained not in databases or mathematical equations but in the text of the scientific literature. “We want to figure out how to get that information out of the literature and into the hands of our scientists when they’re trying to make decisions about which

direction to take with a drug discovery program,” he says. “We’re doing quite a bit of work on categorizing scientific articles according to what molecular processes might be discussed in the text.”. Entelos [13] also focuses on modeling, taking what Paterson calls a “top-down” approach. “We start with the high-level system phenomenon and work down,” he says. “The end point that we care about is not a protein-protein interaction. It’s not even how a cell behaves in culture. It’s how the integrated human system is going to behave.” Entelos wants to understand the clinical end points of disease. The challenges associated with the top-down approach are the same as those in reverse engineering, according to Paterson. In particular, there are often going to be gaps in the knowledge of the system. “We’re very much driven by mapping out what we don’t know,” Paterson says [13]. “In the areas that we don’t know things, where we have knowledge gaps, we have a systematic procedure where we formulate multiple competing hypotheses and then test those hypotheses mathematically to see if they are consistent with the overall data. In many cases, it allows us to triangulate on the right answer”. Paterson believes the top-down approach is particularly suited to modeling complicated diseases. “When you have phenomena at the clinical level that are very complex, that gives us a large number of constraints that are valuable for helping us to reverse engineer those knowledge gaps where we don’t have a lot of understanding,” he says [26]. Entelos is constructing models for diseases such as asthma and diabetes. Systems Biology has the potential to impact a wide range of biological research [6]. For example, the Department of Energy has started a program called Genomes to Life [13], which emphasizes systems biology. The program will focus on applications in

environmental cleanup and new energy sources. In another approach, Genomatica focuses on modeling metabolism, which is the process by which cells gain energy for all other functions. "We feel that metabolism offers a logical starting point for the development of complete cellular models and also complete holistic models of multicellular organisms or whole-body models," Schilling says. The company takes a "constraints-based" approach to metabolism. "The emphasis is on trying to place constraints on metabolism based on physical and chemical laws that govern all systems," such as conservation of mass or energy, Schilling says [6, 13, 26]. These are considered "hard" constraints because they apply equally to all systems. Additional system-specific constraints are provided by the repertoire of reactions that an organism's genome makes available to it. "Based on the limitations of what reactions are available, the stoichiometry of those reactions, and the thermodynamics associated with the reactions, we can further limit what's possible by the cell and by metabolism," he says. Genomatica has concentrated on microbes such as *E. coli* and yeast [2, 27, 28, 29, 30, 31]. The models can be used to predict the performance of an optimally designed microbial strain. Genomatica researchers have found they can use selective pressure to force the organisms to evolve to reach the optimal state, which could have uses in designing microbial strains for bioprocessing and in finding ways to overcome antibiotic resistance. Unlike many other systems biology companies, Beyond Genomics in Waltham, Mass., is emphasizing the experimental aspects. "I view Beyond Genomics' systems biology as an outgrowth of measurement technologies with a sophisticated overlay of bioinformatics,"

says Robert N. McBurney [13], senior vice president for research and development and chief scientific officer. "The in silico stuff is the back end. If you don't have a good biological or clinical experimental design, the back end is completely useless. If you don't have high-quality samples, the back end is useless. If you don't really know what you're doing with your instruments, the back end is useless. I think Beyond Genomics' strength is that we're not an in silico shop." Systems Biology has the potential to impact the entire drug discovery and development timeline "I think systems biology will affect everything we do," Fickett says [13]. "In the context of drug discovery, it's about the connection between the molecular and the physiological. When people look back at these decades from a later viewpoint, they'll see that this was the time when molecular physiology really took off. For example, biomarkers for efficacy and toxicology could lead to more efficient preclinical development. Beyond Genomics is integrating proteomics and metabolomics to find surrogate markers for efficacy and toxicology. "I would say there are more diseases for which we have no surrogate measures for drug efficacy than there are diseases like atherosclerosis, for which we have cholesterol," McBurney says [13]. "When a lot of the first '-omic' technologies came out, one felt that by understanding the gene or the genes that were involved in a disease, you essentially had the way paved for identifying better, safer, more effective targets for drug discovery," says Thomas Colatsky, vice president for health care research at Paradigm Genetics in Research Triangle Park, N.C. "There's been a growing awareness that some of the same risks that always existed in drug discovery and development still exist. The systems biology

approach puts all that information in the context of what happens to the entire organism." "Not only will you identify a disease target to start your drug discovery efforts, but that target will be put in biological context," Schneider says. "You'll understand the pathway it's involved in. You'll understand the metabolic fluxes through that pathway and how they're altered in the disease state. And you'll have a mathematical model you can use as a predictive tool." Paterson hopes that systems biology will help the pharmaceutical industry become more like other R&D-intensive industries, such as the aerospace, automotive, and electronics industries. "They make good use of simulation technologies before they actually build costly prototypes, the equivalent of going to a clinical trial," he says. In contrast, he says, pharmaceutical companies often have only their hypotheses about human efficacy to guide them before Phase II clinical trials, making a large portion of the process trial and error. "The aerospace and automotive industries abandoned trial and error a long time ago. By the time they actually get to driving a prototype, it's all confirmatory," Paterson says. "In the pharmaceutical industry, the cumulative failure rate past Phase I is almost 75%. Even after toxicology in Phase I, 75% of the time the hypothesis about how the drug is going to affect clinical end points is wrong. I see the biggest impact that systems biology is going to have is in fundamentally changing the success rate in clinical trials, particularly Phase II and beyond" [13].

Molecular biology

Molecular biology is the study of biology at a molecular level. The field overlaps with other areas of biology and chemistry, particularly genetics and biochemistry.

Molecular biology chiefly concerns itself with understanding the interactions between the various systems of a cell, including the interactions between DNA, RNA and protein biosynthesis and learning how these interactions are regulated. In this stage the researchers are conducting experiments using different substances, and during experiments the processes are going on with energetic changes, the latter tries to keep the energetic balance of the system. Of course one can assume that energetic fluctuations in molecular stage will cause energetic changes in the next stage, i.e. between the cells in biological systems [2, 5, 10].

Molecular modeling is a collective term that refers to theoretical methods and computational techniques to model or mimic the behavior of molecules. The techniques are used in the fields of computational chemistry, computational biology and materials science for studying molecular systems ranging from small chemical systems to large biological molecules and material assemblies. The simplest calculations can be performed by hand, but inevitably computers are required to perform molecular modeling of any reasonably sized system. The common feature of molecular modeling techniques is the atomistic level description of the molecular systems; the lowest level of information is individual atoms (or a small group of atoms). This is in contrast to quantum chemistry (also known as electronic structure calculations) where electrons are considered explicitly. The benefit of molecular modeling is that it reduces the complexity of the system, allowing many more particles (atoms) to be considered during simulations.

Molecular mechanics is one aspect of molecular modeling, as it refers to the use of classical mechanics/Newtonian mechanics

to describe the physical basis behind the models. Molecular models typically describe atoms (nucleus and electrons collectively) as point charges with an associated mass. The interactions between neighboring atoms are described by spring-like interactions (representing chemical bonds) and van der Waals forces. The Lennard-Jones potential is commonly used to describe van der Waals forces. The electrostatic interactions are computed based on Coulomb's law. Atoms are assigned coordinates in Cartesian space or in internal coordinates, and can also be assigned velocities in dynamical simulations. The atomic velocities are related to the temperature of the system, a macroscopic quantity. The collective mathematical expression is known as a potential function and is related to the system internal energy (U), a thermodynamic quantity equal to the sum of potential and kinetic energies. Methods which minimize the potential energy are known as energy minimization techniques (e.g., steepest descent and conjugate gradient), while methods that model the behaviour of the system with propagation of time are known as molecular dynamics [2].

$$E = E_{\text{bonds}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{dihedral}} + E_{\text{non-bonded}}$$

$$E_{\text{non-bonded}} = E_{\text{electrostatic}} + E_{\text{van der Waals}}$$

This function, referred to as a potential function, computes the molecular potential energy as a sum of energy terms that describe the deviation of bond lengths, bond angles and torsion angles away from equilibrium values, plus terms for non-bonded pairs of atoms describing van der Waals and electrostatic interactions. The set of parameters consisting of equilibrium bond lengths, bond angles, partial charge values, force constants and van der Waals

parameters are collectively known as a force field. Different implementations of molecular mechanics use slightly different mathematical expressions, and therefore, different constants for the potential function. The common force fields in use today have been developed by using high level quantum calculations and/or fitting to experimental data. The technique known as energy minimization is used to find positions of zero gradient for all atoms, in other words, a local energy minimum. This method and theory is very usual for the nanobiology and nanotechnology.

Lower energy states are more stable and are commonly investigated because of their role in chemical and biological processes. A molecular dynamics simulation, on the other hand, computes the behaviour of a system as a function of time.

It involves solving Newton's laws of motion, principally the second law, $F = ma$. Integration of Newton's laws of motion, using different integration algorithms, leads to atomic trajectories in space and time. The force on an atom is defined as the negative gradient of the potential energy function. The energy minimization technique is useful for obtaining a static picture for comparing between states of similar systems, while molecular dynamics provides information about the dynamic processes with the intrinsic inclusion of temperature effects.

Molecular modeling methods are now routinely used to investigate the structure, dynamics and thermodynamics of inorganic, biological, and polymeric systems. The types of biological activity that have been investigated using molecular modeling include protein folding, enzyme catalysis, protein stability, conformational changes associated with bio-molecular function, and molecular recognition of proteins, DNA, and membrane complexes [17, 18].

Nanobiology and Molecular Logic Table

Topics in Biology	Underlying Molecular Phenomenon	Molecular Logic: How molecules behave	Variables	Models Available
Introduction How molecules behave	Molecular Kinetic motion	Molecules move, collide, exchange energy; Heat and Temperature; gas-liquid-solids: phase change and distance between particles	Rat or mice, concentration, temperature, pressure, collisions, distance	MW: Atoms in Motion
Energy	Energy	Energy	Energy	Energy

System biology

Integrative approach in which scientists study pathways and networks will touch all areas of biology, including drug discovery. It's different from molecular biology, which only studies the molecules. It's the phase in-between. The past decade has seen the ascendance of high-throughput methods for measuring the global expression of different components of the biological landscape--genomics, proteomics, metabolomics. These "-omics" often stand in isolation. But the time has come to pull them together to gain an understanding of biology at a higher level, with its complex collection of networks and pathways. Christophe H. Schilling, vice president and chief technology officer at Genomatica in San Diego, agrees that the idea of systems biology is not new. As he worked on his doctoral thesis, he found that "people had talked about systems biology for quite some time," he says. "I think the difference is that it hasn't been until recently that we've had the experimental tools available to begin to look at biological systems." Those experimental tools, Schilling believes, have forced people to take a systems approach. "If you're faced with looking at a microarray with thousands of genes on it, it's a pretty harsh reality to look at that and understand that those are a thousand components that are all working together inside a cell".

Tongue in cheek, Adam P. Arkin, an assistant professor of chemistry and bioengineering at the University of California, Berkeley, and a scientist at Lawrence Berkeley National Laboratory, claims that there's no such thing as systems biology. "Being one of the major proponents of it, I can safely say it doesn't exist," he jokes. "I think I can say that because what people mean by this is what people have always done in biology, which is physiology of cells." Hans V. Westerhoff, a professor of microbial physiology at Free University in Amsterdam, takes a slightly contrarian view. "Systems biology is not the biology of systems," he emphasizes. Instead, he says, it is the region between the individual components and the system, which is why it's new. "It's those new properties that arise when you go from the molecule to the system," he says. "It's different from physiology or holism, which study the entire system. It's different from reductionist things like molecular biology, which only studies the molecules. It's the in-between" [13, 25-32].

Pre-clinical

Steps in the construction of an animal model [8, 15]

1. Drug X has a behavioral effect in humans that resembles human pathology e.g. drug X produces depression when given to humans.

2. Drug X produces similar behavioral effects in animals, allowing for any species differences in behaviour.

3. Drug X produces specific biochemical effects in animals.

4. Thus the biochemical effects produced in animals provide data relevant to the behavioural effect of drug X in humans, If the behavioral effect of drug X in humans has the same characteristics as pathological behavior.

5. Then the biochemical changes produced by drug X in animals may also provide data relevant for the understanding of the abnormal human behavior.

Measuring animal behavior under laboratory conditions

Laboratory system for rat and mice behaviour analysis

An area of psychology called psychopharmacology or behavioral pharmacology is concerned with measuring the effects of drugs on behavior. Exploring the effects of drugs on operant schedules of reinforcement has a long tradition in psychopharmacology. Here is some of the technology used by psychopharmacologists.

A model is a simple representation of a complex system. For example, a model airplane or train looks similar to the real thing but lacks all the features of the full size object. An animal model of a psychiatric disorder is an attempt to capture the essence of the condition, but it does not claim to reproduce the human condition in an animal. Depression, schizophrenia and anxiety are probably uniquely human conditions. One purpose of an animal model is to discover novel medicines that combat the abnormal behavior in the animal model which could be then be used to alleviate human suffering.

Read Barrett and Miczek (2000)

Behavioral Techniques in Preclinical Neuropsychopharmacology Research which is available online and consider the following points:

- Discuss, with examples, the aims of behavioral pharmacology.
- What does the study of behavior contribute to pharmacology?
- Discuss the contribution of the study of conditioned and unconditioned behavior to behavioral pharmacology
- How can the effects of drugs on species-specific behaviors be objectively measured?
- Describe, with examples drawn from your reading, how drugs affect behavior maintained by schedules of reinforcement.
- What has the use of drugs as discriminative stimuli told us about the biological basis of fear?
- How useful are 'simple' behavioral tests in the discovery of novel psychoactive drugs
- What are the limitations of animal models of psychiatric disorders? How may they be overcome?
- Describe the different types of animal model and make definition.
- Are the philosophical roots of behavioral pharmacology in ethology, evolutionary psychology, psychobiology or behaviorism?
- Describe an animal model which is theoretically based on psychological constructs.
- Describe an animal model which is theoretically based on pharmacological constructs.
- What is meant by the terms 'analogy' and 'homology' in physiological and behavioural characteristics? Why are these terms important to behavioral pharmacology?

- Explain, with examples drawn from your reading, the phrase 'reliable animal model'.
- "Mirror, mirror on the wall, who is the prettiest of them all?" Is 'predictive' the prettiest of all the validities?
- What are the most important properties of an animal model?
- To what extent is construct validity ephemeral?
- Does the learned model have etiological validity?
- What factors limit the development of models with etiological validity?
- Is etiological validity desirable (make validation definitions)?
- Will animal models based on genetic manipulations to produce animals with altered neurotransmitter receptor characteristics provide useful models of psychiatric conditions?
- Provide examples of the definition of a construct through convergent operationalism .
- Does 'face validity' provide any value to an animal model?
- Explain the term 'false positive' and 'false negative'.
- Explain the terms tolerance and sensitization.

Methods

Energy effects

So, summing up all stages of drug development we can say that introduction of a drug into the organism produces biochemical reaction which in its turn causes changes in potential energy of the body which conditioned by the internal energy of the body, entropy, thermodynamic energy and the energy of biochemical reaction. These energetic changes bring about energetic disbalance in animal body. After some time according to the law of energy

preservation kinetic energy tends to change striving for balancing potential and kinetic energies. The energetic changes spread to the organism via cells causing behavioral changes. Drug effects are observed and studied through behavioral changes. We can make also the opposite assumption. Behavioral changes in animals are caused by biochemical changes in the body which in its turn brings to energetic changes in the body. E.g. we can say that when injecting the animal antidepressant, the organism relaxes and the animal in immobility state: it loses its vivacity and sensitivity. After some time the weight of the animal is growing, i.e. the potential energy of the animal decreases. This decrease goes with the decrease of kinetic energy (movability). The opposite assumption is: the animal loses its vivacity and it is getting into the state of immobility this process is combined with the decrease of total potential energy. Generally the total energy remains the same during relaxation time; the only change is which behavior takes the major share of energy [23, 24, 25].

1. Understanding this one can say that all energetic changes and deviations come through all the stages of drug development and that is why energy or variables depending upon it are the most important statistical variable for the drug study.

2. It's necessary to make real-time measurements of energetic parameters in all stages of drug development.

3. It is needed to find statistical relationship between energetic changes and transfers of energetic change.

4. The intervals of abrupt energetic changes should be defined precisely and studied.

5. One needs to find the group of functional parameters which depends on energetic changes and to find out functional relationship between them.

6. The studies are conducted in matrix method (i.e. to choose the right group of variables during the studies and the group of functional relations between them based on the existing statistics).

The latter will help to draw more precise conclusions and will generate new ideas for solving the problems. This is very important for the struggle against cancer. Studying the energies of cell link it would be possible to turn it aside from the stage of development and make structural changes in cancer cells. Nanobiology and nanotechnologies are used in this type of research and keeping the new energetic balance by different methods and drugs as well as with new behaviors will encourage quick recovery from the disease.

Rule of energy preservation of the body

The sum of the kinetic energy K and the function U (total potential energy) remains constant as the body moves around in the force-field. It should be clear, by now, that the function U represents some form of *potential energy* [1].

$$E = K + U = \text{constant} :$$

Where K is for the total kinetical energy and U is the total potential energy, particularly in case of absolute balance of kinetic and potential energies.

$$K + U = 0$$

This formula is the equation of energetic balance.

Potential Energy of the Body

The potential energy of the body is dependent upon internal energy of the body, entropy, biochemical energy and thermodynamic energy.

Internal Energy

The total kinetic and potential energy associated with the motions and relative positions of the molecules of an object, excluding the kinetic or potential energy of the object as a whole. An increase in internal energy results in a rise in temperature or a change in phase. Strictly speaking, the internal energy cannot be precisely measured. This is because only changes in the internal energy can be measured, and the total internal energy of a given system is the difference between the internal energy of the system and the internal energy of the same system at absolute zero temperature. Since absolute zero cannot be attained, the total internal energy cannot be precisely measured. The same is true of other thermodynamic parameters such as entropy and the chemical potential.

$$\Delta U = Q + W + W'$$

The First Law of Thermodynamics

The internal energy is essentially defined by the first law of thermodynamics which states that energy is conserved:

$$\Delta U = Q + W + W'$$

where ΔU is the change in internal energy of a system during a process.

Q is heat *added* to a system (measured in joules in SI); that is, a positive value for Q represents heat flow *into* a system while a negative value denotes heat flow *out of* a system.

W is the mechanical work *done on* a system (W -is behavioural and measured in joules in SI)

W' is energy added by all other processes
The first law may be equivalently in infinitesimal terms as:

$$dU = \delta Q + \delta W + \delta W'$$

Although the internal energy is not exactly measurable, it may be expressed in terms of other similarly unmeasurable quantities. Using the above two equations to construct one possible expression for the internal energy gives:

$$dU = TdS - pdV$$

Chemical potential

In thermodynamics and chemistry, chemical potential, symbolized by μ [7],

If we wish to express in a single equation the necessary and sufficient condition of thermodynamic equilibrium for a substance when surrounded by a medium of constant pressure P and temperature T , this equation may be written:

$$\delta(\epsilon - T\eta + Pv) = 0$$

This equation represents total potential energy of the organism. Where ϵ is the internal energy, η is the entropy and Pv is the thermodynamic energy.

When δ refers to the variation produced by any variations in the state of the parts of the body, and (when different parts of the body are in different states) in the proportion in which the body is divided between the different states. The condition of stable equilibrium is that the value of the expression in the parenthesis shall be a minimum.

Kinetic Energy of the Body

Total kinetic energy of the body is often called energy of the mechanical work done by the body and it is assigned with symbol K .

$$K = mv^2/2 + m\omega^2 R^2/2; \omega = 2\pi F$$

where F is the frequency of oscillation

In other words, the increase in the kinetic energy of the body, as it moves from point O to point X is equal to the decrease in the function U evaluated between these same two points. Another way of putting this is

$$\Delta U + \delta(\epsilon - T\eta + Pv) = mv^2/2 + m\omega^2 R^2/2$$

This is the equation of the energetic balance for the body.

Total kinetic energy is $\sum E_k$ or integral and total potential energy is $\sum E_p$ or integral.

$$\sum E_p = \sum E_k$$

$$\sum E_k = mv^2/2 + m\omega^2 R^2/2$$

The latter is mechanical work, the energy of which can be obtained to a first approximation after processing the signal received from Laboras system. Differing from other detection methods of behaviours Laboras enables the researchers to make more accurate measurements of kinetic energy; one of its components depends upon motion (locomotion energy), the second component depends upon oscillation energy which is measured by other systems as infrared rays and using video systems to measure it is impossible because of the existing theoretic limitations (dynamic camera focus, big distance between video camera and animal, visual part of animal is limited, infrared rays cannot process the signals)

$$E (\text{locomotion energy}) = mv^2/2$$

This is the kinetic energy depending upon the locomotion behaviour of the animal.

$$E (\text{Oscillation energy}) = m\omega^2 R^2/2$$



Photo 1. Laboras system.

ω - is for the cyclic frequency. This is the kinetic energy depending upon different movements of the animal without shift. Laboras system of Metris B.V. company enables to measure these two types of kinetic energy while other automated systems for behaviour detection can measure kinetic energy being limited by only one component, i.e. by locomotion energy.

Conclusion

The theoretic limitations of the other systems for automated behaviour detection (video systems, system of infrared rays) are as follows:

1. Indirect contact with the animal, i.e. the animal has no direct contact with sensors (video camera, infrared sensors) located at a certain distance do not provide a possibility to measure oscillation energy as the oscillation radius (R) is too small compared with the distance from the sensors.

2. Dynamic focus of video camera (focus 1, focus 2, etc.) does not provide a possibility to measure precisely the oscillation frequency of such behaviours as Head Shakes, Scratching, and Wet Dog Shakes. The latter provides oscillation in conditions of immobility; they are of high frequency and have short duration.

3. The camera cannot embrace the animal completely (animal body is embraced only in certain segment of the camera).

One can say that currently Laboras is the only system which gives an opportunity to measure energy totally which enables

to detect all types of complex behaviors even the very short ones starting from 0.1 seconds and above and the ones of high frequency ($F = 15\text{Hz}$ and above).

So, we can conclude that all other systems can be used only for the detection of tracking parameters. These systems (video systems, infrared sensors) measure only a part of the energy – Locomotion energy – but Laboras measures the total energy of animal behavior as the system has direct contact with the animal through weight sensors. So, the researchers get quite pure signal through the Laboras system. After the processing of the signals it is possible to detect very complex behaviours of the animals such as Head Shakes, Head Twitches, Wet Dog Shakes, and Scratching which have short duration and high frequency. I.e. other automated systems for behaviour detection enable to detect only the behaviours which are connected with locomotion behavior. Laboras system does not have such limitations as it is based on energy detection which is the most important parameter in all stages of drug development.

Laboras system for automated behaviour detection of Metris B.V. Company provides a possibility to detect accurately and record very weak, short and high frequency behaviours. Laboras system can also find and record very important statistics for the behaviour which are customer-specific: if the researcher gives the accurate definition of the behaviour and develops the list of necessary statistical parameters and functions then Laboras system has that option of determining that list and presenting it as it was required.

The group of parameters and functions provided by the researcher is very important: they have connections with all stages of drug development. And their accurate

Energy Dependent Parameters which Enable the System to Detect Behaviors

Behavior name	Video system	Infrared system	Laboras system
	E(locomotion)	E(locomotion)	E(kinetic total)= E(locomotion)+ E(ostilation)
	$E = mv^2 / 2$	$E = mv^2 / 2$	E(Oscilation energy) = $mw R^2 / 2$
Locomotion	yes	yes	yes
Position + circling	yes	yes	yes
Velocity	yes	yes	yes
Climbing	yes	yes/no	yes
Grooming	yes/no 50%	no	yes
Eating	yes/no 50%	no	yes
Drinking	yes/no 50%	no	yes
Rearing	yes/no 50%	yes/no 50%	yes
Scratching	no	no	yes
Seizure	no	no	yes
WDS	no	no	yes
HS	no	no	yes
HT	no	no	yes
Formalin	no	no	yes

definition is necessary for the study process and the obtained results and it is extremely important to have the precise definitions and animal species which are input data for the solution of recognition problems.

The study will show excellent results if appropriate specialists for each stage of development are selected and the definitions for automated detection are accurately made.

Force measurement vs Observation methods

The movements of the behaviors that result in oscillation energy are often short, weak, fast and highly repetitive and therefore difficult or impossible to observe or record on video (such as head shakes, scratches, chewing). Metris has

developed the LABORAS system that is able to measure total movements (kinetic energy) in a reliable and non-invasive way using force transducers under the cage of the animal

Matrix method for Behavior Analysis

Proper analysis and statistics of data is very important in *in-vivo* experiments. The use of many independent parameters in the automated recognition of a behavior of the animal is therefore crucial. To recognize a behavior automatically, LABORAS applies the 'Matrix Method' involving the analysis of several parameters that are derived from the measurement system.

Your specific behavior = matrix $/X_1, X_2, X_3, \dots, X_n; Y_1, Y_2, Y_3, \dots, Y_n; E_1, E_2, E_3, \dots, E_n/$

The above matrix shows an example of the different parameters for a specific behavior. Where $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$; $E_1, E_2, E_3, \dots, E_n$ are functions from the specific behavior (e.g. amplitude, frequency, total energy, locomotion energy, locomotion energy / oscillation energy, etc.).

Conclusion and results

Measuring matrix parameters in *in-vivo* experiments is very important to obtain a full ethogram of all behaviors that are shown by the laboratory animal. Traditional methods based on observation or video analysis are too limited for this.

Metris' LABORAS system enables measurement of all types of kinetic energy while other non-invasive automated systems for behavior detection can only measure the locomotion component of the kinetic energy (e.g. locomotion energy $mv^2/2$). In addition the matrix method and technology used in Laboras provides a way to measure more behaviors and to recognize them completely automatic and more precisely than ever before.

Laboras is globally considered as the best method for Animal Behavioral Research

Integration of behavioral parameters with physiological parameters

For the properly the build your study is better integrate behavioral analysis with telemetry analysis.

In this case you make the matrix of statistical parameters bigger and stabile for 24 hour animal study.

Laboras system can integrate with DSI telemetry system and in the same result summary analyze Physiological and behavioral parameters.

The best and quick results from your pre clinical study:

- For behavioral study use matrix

parameters from the behavior and not only tracking parameters / use Laboras system for behavior recognition and analysis.

- For ultrasounds vocalization study use Sonotrack system and integrate with Laboras results.
- Integrate DSI - telemetry parameters with Laboras results and get the best analysis tool.
- How bigger your analysis matrix (group of parameters) how better your statistic and results from the experiments.

References

1. <http://farside.ph.utexas.edu/teaching/301/lectures/node60.html>
2. <http://en.wikipedia.org/wiki/Metabolism>
3. http://www.bio-medicine.org/biology-definition/Activation_energy/
4. http://www.bio-medicine.org/biology-definition/Free_energy/
5. http://www.bio-medicine.org/biology-definition/Kinetic_energy/
6. http://www.bio-medicine.org/biology-definition/Potential_energy/
7. http://en.wikipedia.org/wiki/Chemical_potential
8. <http://www.hsc.wvu.edu/sop/compchem/mdpi/entropy/papers/e3030116.pdf>
9. <http://www.answers.com/topic/internal-energy?cat=technology&hl=potential>
10. <http://www.tulane.edu/~millonas/home/blowtorch.pdf> [mol]
11. <http://www.hsc.wvu.edu/sop/compchem/mdpi/entropy/papers/e3030116.pdf> [bio publ]
12. http://www.hsph.harvard.edu/vitalstat/t561/MW_Overview.v2.pdf[bio [pub]
13. <http://pubs.acs.org/cen/coverstory/8120/8120biology.html>[bio]
14. http://www.concord.org/~btinker/molo/MoLo_Table_v_1.5.2.html[mol]

15. http://www.flyfishingdevon.co.uk/salmon/year3/psy364animal_models/animal_models_of_human_behaviour.htm
16. <http://www.grandin.com/references/genetics.html>
17. http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/energy_enzymes_catalysis/01Q.html
18. http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/energy_enzymes_catalysis/04t.html
19. http://koso.ucsd.edu/~martin/Paulusfd1_1992.pdf [video lim. micro behav]
20. <http://cshprotocols.cshlp.org/cgi/content/abstract/2007/18/pdb.prot4800>
21. http://www.cs.utah.edu/~tch/classes/karlsruhe/myseminar_files/report.pdf
22. <http://www.boingboing.net/2008/11/17/tsa-behavior-detecti.html>
23. http://rus-neuroscience-soc.bm-science.com/pubdocs/Stress_and_Behavior_2008-School_Proceedings.pdf
24. http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WDT-4FRB7SV-3&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=45d41e72c7dfea73f787214158538bc5
25. <http://si-pddr.si.edu/dspace/bitstream/10088/4358/1/Gittleman1988c.pdf>
26. <http://nl.youtube.com/watch?v=EI8eJmF-ubc&feature=related>
27. <http://nl.youtube.com/watch?v=g0E22B1miVM&feature=related>
28. <http://nl.youtube.com/watch?v=MbpyMCQGQIU&feature=related>
29. <http://nl.youtube.com/watch?v=ixgFEMWd8Ps>
30. <http://nl.youtube.com/watch?v=4TGD PotbJV4&feature=related>
31. http://nl.youtube.com/watch?v=2WwIKdyBN_s&feature=related
32. <http://www.docstoc.com/docs/2249799/What-is-environmental-toxicology>

Усовершенствование технологий и интеграционные параметры доклинических исследований

Л. Багдасарян, Р. Бултуис, Э. Молевик, С. Гучков, А. Ревякин

Лекарства, проникая в организм, изменяют его потенциальную энергию, а через некоторое время и кинетическую, что выражается в поведенческих реакциях животных и человека. Это означает, что энергия является наиболее важным параметром на всех стадиях создания лекарств – от молекулярной биологии до клинических исследований.

Система Laboras, созданная компанией Metris B.V., измеряет общую кинетическую энергию, в отличие от других автоматизированных систем, распознающих поведение только по энергии передвижения животных. В результате использования системы Laboras исследователь получает такие формы поведения животных как встряхивание головы, подергивание головой, «отряхивание мокрой собаки» и почесывание, не распознаваемые другими системами. Система Laboras может интегрироваться с DSI-телеметрической системой и, таким образом, анализировать физиологические и поведенческие параметры одновременно. Система также интегрируется с системой Sonotrack для изучения ультразвуковой вокализации.

Ключевые слова: доклинические исследования, система Laboras, параметры поведения, энергия.

Инструментальная коррекция жизненного сценария путем нейромодуляции психофункциональных состояний

Н.Н. Каркищенко¹, Д.Б. Чайванов², Ю.А. Чудина²

¹ – ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России», Московская область

² – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Контактная информация: академик РАН, чл.-корр. РАН Каркищенко Николай Николаевич, niknik2808@yandex.ru; к.ф.-м.н. Чайванов Дмитрий Борисович, chaivanov@yandex.ru

В работе обсуждается возможность применения методов нейромодуляции и создания инструментального аналога транзактного анализа для коррекции жизненного сценария посредством воздействия на эго-состояния.

Ключевые слова: нейромодуляция мозга, микрополяризация, магнестимуляция, электросон, транзактный анализ, эго-состояние, когнитивная стратегия, онтогенез корковых структур.

Давно замечено, что здоровье человека определяется двумя составляющими – физиологической и психологической, из которых ведущая роль принадлежит психологическому состоянию. Гармония психологической жизни является залогом и физиологического здоровья, и долголетия, в то время как отсутствие психологического комфорта или его постоянное нарушение приводит к развитию физических патологий, часто являющихся причинами хронических заболеваний и преждевременного старения. В этой связи, известное высказывание «Mens sana in corpore sano» можно перефразировать как «В здоровом духе здоровое тело». Достижение оптимального психофизиологического состояния, обеспечивающего наилучшую жизнедеятельность, зависит от адаптивных возможностей человека, которые непосредственно связаны с гомеостазом, психической и психологической саморегуляцией.

Отсутствие физических нагрузок, гиподинамия и чрезмерные информацион-

ные нагрузки, нестабильность социально-психологических отношений часто могут стать причиной не только психологических, но и психических нарушений, которые усугубляются общими проблемами внутреннего мира человека. Это является причиной развития серьезных психических заболеваний, требующих специализированной психотерапевтической помощи. При несбалансированности внутреннего мира у человека с высокой психологической саморегуляцией, как правило, не возникают психические патологии. Однако у него могут развиваться серьезные искажения физиологических функций, переходящие в хронические заболевания. В этой связи, весьма актуальным является разработка инструментальных способов коррекции психофункциональных состояний и когнитивных стратегий человека [7].

В данной работе мы будем рассматривать алгоритм коррекции психофункциональных состояний и когнитивных стратегий, основываясь на представлении о

жизненном сценарии, его формировании и изменении в рамках транзактного анализа [1, 4]. По мнению автора транзактного анализа Э. Берна, жизненные сценарии формируются в младенчестве и зависят от взаимоотношений ребенка с родителями, прежде всего – с матерью, и с другими окружающими его людьми. Формирование психики человека и его жизненного сценария связано с последовательной актуализацией эго-состояний. В норме эго-состояния следуют друг за другом, и каждое следующее опирается на предыдущее. Всего Э. Берна выделил три эго-состояния: ребенок (ЭСД), родитель (ЭСР) и взрослый (ЭСВ).

В начале жизни преобладает ЭСД, которое позволяет человеку нормально развиваться и обеспечить успешное первоначальное приспособление к окружающим условиям. В связи с этим, ЭСД характеризуется спонтанностью, полезависимостью и непроизвольностью поведения, что связано с целостностью восприятия, эмоциональной непосредственностью и отсутствием какого-либо внутреннего контроля [2]. Соответствующая ЭСД когнитивная стратегия реализуется как «действие в ответ», т.е. все реакции ребенка – как физиологические, так и психологические – являются ответом на взаимодействие со значимыми взрослыми. В зависимости от этих первых социальных взаимоотношений с родителями формируется жизненный сценарий, который может быть актуализирован путем отключения фронтальной коры и третьичных зон обоих полушарий и преимущественной модуляцией медленных ритмов [8].

По мере взросления – около трех лет – у ребенка формируются еще два эго-состояния: ЭСР и ЭСВ. ЭСР связано с социальной адаптацией и развитием личности. Появление ЭСР позволяет ребенку расширить свое социальное окружение,

он усваивает социальные нормы, правила поведения и установки, что способствует определению его социальной роли. Специфическая когнитивная стратегия, соответствующая ЭСР, характеризуется поведением «по правилам», хотя появляется некоторая произвольность, но она полностью подчиняется усвоенным социальным требованиям. В данном эго-состоянии поведение ребенка характеризуется произвольностью и избирательностью, появляется внутренний контроль собственных действий, основанный на социальных стереотипах. ЭСР связано с развитием фронтальных отделов коры правого полушария и окончательным развитием третьичных зон сенсорной коры обоих полушарий, а также с ведущей ролью альфа-ритма [8].

Параллельно с ЭСР формируется ЭСВ, которое проявляется ближе к школьному возрасту. Для ЭСВ типичен комплексный анализ ситуации, принятие рациональных решений, которые принимаются на основе прошлого опыта, индивидуальных знаний и обучения. В данном случае преобладает сознательное управление собственным поведением, опирающееся на личный и социальный опыт. Значительную роль играют усвоенные, в том числе в процессе обучения, закономерности окружающего мира и логическое мышление. Соответствующая когнитивная стратегия характеризуется самостоятельностью, рациональностью и логичностью принятия решений и личностно детерминированной свободой поведения. С физиологической точки зрения, ЭСВ характеризуется зрелостью корково-подкорковых отношений и всей коры, в том числе левой лобной зоны. Отмечается ведущая роль левого полушария и устойчивость межполушарного взаимодействия. В состоянии бодрствования преобладают высокочастотные

ритмы, а в состоянии сна – низкочастотные [2]. Актуализация ЭСВ требует активации, в первую очередь, левой фронтальной зоны коры при сопутствующем возбуждении третичных областей обоих полушарий [8].

Обобщая, можно утверждать, что формирование жизненного сценария начинается после рождения и первоначально реализуется в ЭСД, затем в ЭСР и ЭСВ он уточняется, но не претерпевает существенных изменений. Сформированный жизненный сценарий является бессознательным. Его непредставленность в сознании, с одной стороны, делает его скрытым от сознательного контроля и наблюдения субъекта, что не позволяет субъекту самостоятельно управлять и корректировать свой жизненный сценарий, а с другой стороны – постоянно влияющим на поведение субъекта. Экспериментально показано, что реакция на подпороговые, неосознаваемые воздействия, формируется значительно быстрее и является более прочной по сравнению с реакцией на осознаваемые воздействия [5]. Следовательно, жизненный сценарий является устойчивой бессознательной настройкой мозга, которая определяет способы и приемы реагирования субъекта, возможности установления социальных контактов, решение нестандартных задач, формирование психических установок и когнитивных стратегий. Возможность коррекции жизненного сценария позволит человеку избавиться от нежелательных или неэффективных способов реагирования и, главное, будет способствовать гармонизации психического здоровья субъекта.

К сожалению, большинство жизненных сценариев, выделенных Э. Берном, являются причиной психологических и психических расстройств и проявляются в виде искаженных (пересекающихся,

скрытых) транзакций. Общение между людьми, определяемое цепочкой искаженных транзакций, становится неадекватным или полностью разрушается. Э. Берн предлагает в качестве способа коррекции жизненных сценариев освобождение от них, в основе которого лежит осознанное непосредственное восприятие и реагирование «здесь и сейчас» [1, 4].

Мы предполагаем, что с помощью определенного алгоритма нейромодуляции с использованием методов электромагнитной стимуляции мозга возможна инструментальная коррекция жизненных сценариев. Первоначально с помощью метода электрогипноза [7] необходимо ввести пациента в гипнотическое состояние, глубина которого регулируется на основе индивидуальной динамики вегетативных показателей. Методика электрогипноза основана на изменении состояния сознания пациента путем электрического воздействия на подкорковые структуры мозга. Затем на фоне общего электрогипнотического воздействия для актуализации жизненного сценария необходимо смоделировать ЭСД. Для этого необходимо обеспечить торможение фронтальной коры и третичных зон обоих полушарий, что позволяет сделать микрополяризацию, и создать преимущественную модуляцию медленных ритмов с помощью магнитной стимуляции. Избирательная актуализация ЭСД на фоне выхода из гипнотического состояния позволит перевести в сознание индивидуальный жизненный сценарий, хранящийся в бессознательном виде. Пациент, осознающий свой жизненный сценарий, даже частично получает возможность работать с ним и скорректировать его. Важным этапом выявления особенностей жизненного сценария является клиническая беседа с пациентом до стимуляции и фиксация его когнитивных

и поведенческих стратегий после нее. Становится понятной необходимость разработки специфических методик опроса, когнитивных и поведенческих тестов. Предварительная процедура обследования позволит ограничить круг жизненных сценариев и социальных ролей, специфических для каждого субъекта, и наметить пути коррекции.

Выявление жизненного сценария и определение вклада ЭСР в этот сценарий являются необходимыми этапами на пути его коррекции. Вклад ЭСР можно определить при активации психофункционального состояния, соответствующего ЭСР, в состоянии гипноза. Предположительно, пациент сам начнет играть роль своих родителей, которые способствовали созданию его жизненного сценария. Далее, на фоне подавления активности зон мозга, которые создают психофункциональное состояние, соответствующее ЭСР, предполагается активировать те зоны, которые связаны с ЭСД и ЭСВ. Актуализация ЭСВ является обязательным условием осознания базовых особенностей индивидуального жизненного сценария. Как правило, коррекция жизненного сценария связана с подавлением ЭСР и активацией ЭСВ [1].

Подавление ЭСР требует торможения фронтальной области правого полушария и активация той же зоны левого полушария. Активация ЭСВ требует возбуждения фронтальной коры левого полушария и третичных зон обоих полушарий. Для актуализации и подавления соответствующих эго-состояний мы предлагаем использовать два метода электромагнитного воздействия на мозг: транскраниальную микрополяризацию (ТКМП) и транскраниальную магнитостимуляцию (ТМС). С помощью метода ТКМП возможна избирательная активация и торможение опре-

деленных зон коры больших полушарий [9, 3] в зависимости от необходимости создания определенного психофункционального состояния мозга, соответствующего динамике эго-состояний. При этом метод ТКМП позволяет избирательно и динамично менять локальные зоны активации и торможения в зависимости от задачи. Анализ исследований по применению микрополяризационных воздействий показал, что существенное значение имеют участки воздействия, сила и плотность тока, длительность его экспозиции, расположение активного и референтного электродов, схема осуществления воздействия, но также и общее количество электродов и использование межполушарной стимуляции. Метод ТМС позволяет изменять ритмическую активность полушарий, причем, в зависимости от задачи, можно независимо модулировать активность разной частоты в каждом полушарии: например, в правом полушарии модулировать низкочастотную активность, а в левом – высокочастотную, и наоборот [6].

Обобщая, можно говорить о следующем общем алгоритме инструментальной коррекции жизненного сценария. Сначала с помощью метода электрогипноза создается общее расслабленное и гипнотическое состояние. Далее методом ТКМП осуществляется избирательная активация и торможение определенных зон коры, которая с помощью метода ТМС сопровождается модуляцией ритмической активности этих зон. Моделирование определенной ритмической активности позволит актуализировать соответствующее эго-состояние, так как именно динамика ритмической активности является показателем разных этапов развития мозга [2, 8]. Микрополяризация определенных зон коры позволит скорректировать сформировавшиеся и сфор-

мировать заторможенные когнитивные и поведенческие стратегии.

Безусловно, рассмотренный выше алгоритм нейромодуляции психофункциональных состояний, являющихся основой динамики эго-состояний, требует дополнительного теоретического анализа и экспериментальной апробации. Однако проведенный нами анализ возможностей использования электромагнитных методов, их экспериментального применения для изменения таких когнитивных функций как восприятие, внимание, память, обучение, эмоциональное и мотивационное напряжение и т.п., делает ожидаемый экспериментальный результат предсказуемым и перспективным.

Список литературы

1. *Берн Э.* Игры, в которые играют люди. Люди, которые играют в игры. Изд.: Университетская книга. М. 1998.
2. *Дубровинская Н.В., Фарбер Д.А., Безруких М.М.* Психофизиология ребенка: Психофизиологические основы детской валеологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. – М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС. 2000.
3. *Илюхина В.А.* Теоретические и прикладные аспекты транскраниальных

микрополяризации в психофизиологии и клинике // Лечебная электрическая стимуляция мозга и нервов человека / Под общ. ред. Н.П. Бехтеревой. – М. АСТ; СПб.: Сова; Владимир: ВКТ. 2008. С. 378-461.

4. *Классен И.А.* Практическая психотерапия: Курс лекций. М.: МЕДпресс-информ. 2004.
5. *Костандов Э.А.* Психофизиология сознания и бессознательного. – СПб.: Питер. 2004.
6. *Никитин С.С., Куренков А.Л.* Магнитная стимуляция в диагностике и лечении болезней нервной системы. М.: 2003.
7. *Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А.* Применение технологии нейромодуляции для управления психофункциональным состоянием и когнитивными стратегиями человека // Вестник РУДН, сер. Психология и педагогика. 2011. № 2. С. 32-38.
8. *Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А.* Применение нейромодуляции для коррекции психофункциональных состояний в процессе трансактного анализа // Вестник РУДН, сер. Психология и педагогика. 2011. № 4. С. 38-43.
9. *Шелякин А.М., Пономаренко Г.Н.* Микрополяризация мозга. СПб. 2006.

Tool corrections of the vital scenario by neuromodulation of psychofunctional conditions

N.N. Karkischenko, D.B. Chayvanov, Yu.A. Chudina

In this article have been discussing the algorithm of neuromodulation methods and creation toolmaking counterpart of the transactional analysis having used for ego-states alterations and the correction of individual script.

Key words: brain neuromodulation, micropolarization, magnetostimulation, electrodream, transactional analysis, ego condition, cognitive strategy, ontogenesis of cortical structures.

Оценка влияния некоторых физических факторов на энергетический метаболизм крови *in vitro*

А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьева, С.П. Перетягин, В.Н. Митрофанов

ФГБУ «ННИИТО» Минздравсоцразвития России

Контактная информация: к.м.н. Мартусевич А.К., cryst-mart@yandex.ru

Проведен анализ действия кислорода, синглетного кислорода, оксида азота (800 мкг/л) и озона (500 мкг/л) на цельную кровь человека *in vitro* по параметрам энергетического метаболизма (активность оксидоредуктаз, уровень лактата). Для комплексной оценки эффекта физических факторов применены разработанные нами производные коэффициенты. Установлено, что обработка крови кислородом, озон-кислородной смесью и синглетным кислородом благоприятно стимулирует энергетические резервы биосреды, а нитрокислирование угнетает их.

Ключевые слова: активные формы кислорода, оксид азота, оксидоредуктазы, лактат.

Система крови, являясь основной жидкой средой, традиционно рассматривается как интегральный индикатор состояния целостного организма на различные воздействия [10]. Этому способствует наличие в ее составе как многочисленных клеточных пулов, так и жидкой части – плазмы, в комплексе обеспечивающих биологические и физико-химические свойства данного биосубстрата и его адаптационно-гомеостатический потенциал [1]. С учетом активно протекающих в рассматриваемой биосреде процессов, обеспечивающих энергетический обмен ее клеточной составляющей, цельная кровь служит достаточно удобной биомоделью для оценки эффекта различных, в частности, физико-химических факторов на указанный аспект метаболизма.

В настоящее время установлено, что действие многих лекарственных препаратов и лечебных воздействий физическими факторами опосредовано через модификацию направленности и интенсивности процессов липопероксидации, а также генерацию, циркуляцию и деградацию активных биорадикалов,

в том числе представленных активными формами кислорода и азота [2, 4-8, 11]. Кроме того, в последнее десятилетие особое внимание уделяется полифункциональной роли оксида азота (II) как универсального биорегулятора и дополнительного источника биорадикалов [3, 4, 7, 12].

В связи с этим, **целью** исследования служило изучение влияния газообразных активных форм кислорода и оксида азота (II) на параметры энергетического метаболизма крови в эксперименте.

Материалы и методы

Изучен характер реакции цельной консервированной крови на воздействие различных физико-химических факторов, являющихся источниками активных форм кислорода и азота. Использовали кровь, полученную от 10 доноров (по 25 мл). Для проведения эксперимента ее разделяли на 5 порций (интактную, на которую не оказывали воздействий, и 4 опытных, подвергшихся обработке). Для этого производили прямой барботаж образцов крови (5 мл) газообразным аген-

Таблица

Основные и расчетные параметры энергетического метаболизма крови при действии различных источников активных форм кислорода и азота

Параметр	Фактор				
	контроль	кислород	озон	оксид азота	синглетный кислород
ЛДГпр, нмоль НАДН/мин* мг белка	51,99±2,84	58,15±3,27*	60,29±4,12*	44,18±3,20*	54,09±3,37
ЛДГобр, нмоль НАДН/мин* мг белка	21,76±1,63	24,32±1,70	32,42±2,28*	40,58±2,71*	28,09±2,06*
Лактат плазмы, ммоль/л	6,93±0,21	7,15±0,24	7,15±0,26	6,65±0,22	7,37±0,23*
Лактат эритроцитов, ммоль/л	3,00±0,17	3,05±0,18	2,67±0,14*	3,33±0,16	2,70±0,15*

Примечание: «*» – статистически значимые различия по сравнению с контрольным образцом, $p < 0,05$ (по парному критерию Стьюдента).

том (молекулярный кислород, озон – 50 мкг, оксид азота – 80 мкг, синглетный кислород) в течение 2 мин. Синтез озono-кислородной смеси осуществляли с помощью озонатора «Медозонс-БМ» (Россия). Генерацию холодной плазмы, насыщенной оксидом азота (концентрация вещества в газовом потоке в выбранных условиях – 800 мкг/л), выполняли аппаратом «Плазон» (Россия). Воздушный поток, содержащий синглетный кислород, получали с применением аппарата «Airnergy» (Германия). Экспозиция после воздействия составляла 3 мин.

В донорской консервированной крови спектрофотометрически определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в прямой и обратной реакциях по методу Г.А. Кочетова (1980), альдегиддегидрогеназы (АлДГ) – по методу Б.М. Кершенгольца, Е.В. Серкиной (1981). Содержание белка устанавливали по модифицированному методу Лоури. Уровень лактата в плазме крови и эритроцитах определяли с помощью анализатора SuperGL Ambulance.

Для оценки направленности сдвигов энергетического метаболизма крови при

действии выбранных физико-химических факторов использовали ряд специализированных коэффициентов: коэффициент баланса энергетических реакций (КБЭР) [9], коэффициент субстратной обеспеченности (КСО), нормализованный коэффициент субстратной обеспеченности (КСО_{norm}). Расчет данных показателей производили по следующим формулам:

$$КБЭР = \frac{ЛДГ_{пр}^2}{ЛДГ_{обр}^2} \cdot 100$$

где ЛДГ_{пр} – активность ЛДГ в прямой реакции, ЛДГ_{обр} – активность ЛДГ в обратной реакции;

$$КСО = \frac{C(\text{лактат}) \cdot ЛДГ_{пр}}{ЛДГ_{обр}}$$

где C(лактат) – концентрация лактата в плазме крови, ЛДГ_{пр} и ЛДГ_{обр} – аналогично предыдущей формуле;

$$КСО_{norm} = \frac{C(\text{лактат}) \cdot ЛДГ_{пр}}{ЛДГ_{обр}} \cdot \frac{ЛДГ_{обр, контроль}}{ЛДГ_{пр, контроль}} \cdot \frac{C(\text{лактат})_{контроль}}{ЛДГ_{пр, контроль}}$$

где C(лактат), ЛДГ_{пр} и ЛДГ_{обр} – аналогично предыдущей формуле, ЛДГ_{пр, контроль} – активность ЛДГ в прямой реакции в интактном образце,

ЛДГ_{обр, контроль} – активность ЛДГ в обратной реакции в интактном образце.

Результаты обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

Анализ состояния энергетического обмена крови оценивали как с позиций субстратного обеспечения процесса, так и активности ферментных систем (табл.).

Прежде всего, нами произведен анализ применимости консервированной крови для достижения цели исследования. На основании полученных данных установлено, что в цельной консервированной крови активность ЛДГ в обратной реакции преобладает над активностью фермента в прямой, что совпадает с динамикой, наблюдающейся в свежеполученной крови [9], и свидетельствует об отсутствии значимого влияния применяемого консерванта на ее рассматриваемые параметры. Следовательно, используемая биомодель цельной консервированной крови является адекватной и может быть применена для оценки характера воздействия на нее выбранных физико-химических факторов.

Вторым этапом работы явилось непосредственное определение особенностей действия источников активных форм кислорода и азота на состояние энергетического метаболизма биологической жидкости. Установлено, что активность ЛДГ в прямой реакции при действии на образцы цельной крови изучаемых физических факторов существенно варьирует (табл.). Так, при барботировании биологической жидкости кислородом и озono-кислородной смесью с концентрацией озона 500 мкг/л наблюдали значимое нарастание данного показателя (на 11 и 15% относительно контрольного образца соответственно; $p < 0,05$), тогда как введе-

ние в биосреду газообразного монооксида азота снижало активность этого фермента в прямой реакции (на 15%; $p < 0,05$). Применение синглетного кислорода не оказывало существенного влияния на рассматриваемый параметр.

Повышенная активность ЛДГ в обратной реакции была зарегистрирована при воздействии на образцы крови оксида азота, озono-кислородной смеси и, в меньшей степени, синглетного кислорода (на 86, 48 и 29% соответственно; $p < 0,05$). В условиях действия на биологическую жидкость газообразного оксида азота данная тенденция в сочетании с падением активности лактатдегидрогеназы в прямой реакции создает предпосылки для нарастания энергодефицита клеток крови.

Изучение уровня лактата в плазме крови, демонстрирующего в том числе результат функционирования ЛДГ, позволило установить, что большинство оцениваемых факторов не оказывает существенного влияния на концентрацию изучаемого соединения (нарастание в диапазоне 3-6% относительно контрольного образца). Только при барботировании биологической жидкости синглетным кислородом выявлено статистически значимое нарастание указанного показателя ($p < 0,05$). При обработке консервированной крови газовым потоком, содержащим монооксид азота, наблюдали умеренное падение уровня лактата в ней на уровне тенденции.

С наших позиций клинически важны результаты определения содержания лактата в эритроцитах как модели клеточной биосистемы. Выявлено, что концентрация лактата в эритроцитах сохраняется на исходном уровне только в случае оксигенации биологической системы. В то же время, после обработки консервированной крови озono-кисло-

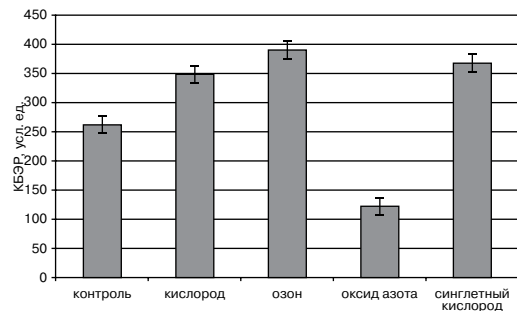


Рис. 1. Уровень коэффициента баланса энергетических реакций (КБЭР) крови при действии источников активных форм кислорода и азота.

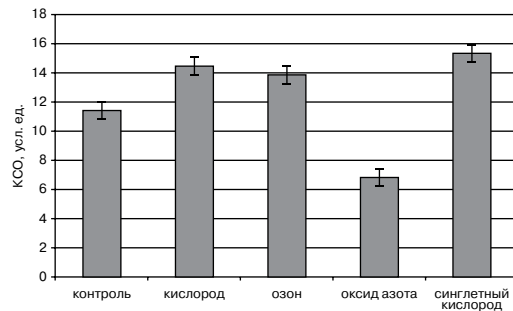


Рис. 2. Уровень коэффициента субстратного обеспечения (КСО) крови при действии на нее различных активных форм кислорода и азота.

родной смесью и синглетным кислородом регистрировали значимое снижение значения данного показателя (на 11 и 10% соответственно; $p < 0,05$), что косвенно указывает на антигипоксический эффект изучаемых воздействий. Это обеспечивается стимуляцией активными формами кислорода аэробного пути функционирования ЛДГ и, соответственно, направленной утилизацией лактата на нужды энергообеспечения клетки при озонировании биологической жидкости.

Напротив, при барботировании цельной крови оксидом азота, на фоне ингибирования прямой реакции ЛДГ и нарастания интенсивности обратной реакции, содержание лактата в эритроцитах увеличивалось на 11% относительно контрольных значений, что может рассматриваться как тенденция ($p < 0,1$). Указанные сдвиги свидетельствуют о формировании признаков гипоксии при нитроксилировании биосреды, которая может дополнительно стимулироваться за счет NO-зависимого образования метгемоглобина при применяемых концентрациях физического агента (800 мкг/л оксида азота) [2, 7].

С целью получения интегральной информации о сдвигах энергетического

метаболизма, инициированных источниками активных форм кислорода и азота, нами был осуществлен расчет некоторых производных коэффициентов, позволяющих оценить сбалансированность рассматриваемого компонента обменных процессов (рис. 1-3). На основании анализа динамики КБЭР выявлено (рис. 1), что барботирование цельной крови озono-кислородной смесью, синглетным кислородом и молекулярным кислородом способствует смещению активности ЛДГ в сторону прямой реакции ($p < 0,05$). Следует отметить, что в случае применения озона активация ЛДГ при также значительна, но сопровождается умеренной стимуляцией обратной реакции (табл.). Нитроксилирование крови, напротив, приводит к преобладанию ЛДГобр на фоне ингибирования аэробного процесса ($p < 0,05$).

Адекватность функционирования ЛДГ с учетом концентрации в биологической жидкости лактата при действии различных источников активных форм кислорода и азота оценивали с помощью классического и нормализованного коэффициентов субстратного обеспечения – КСО и КСОnorm (рис. 2 и 3). По нашим данным, физиологический уровень КСО,

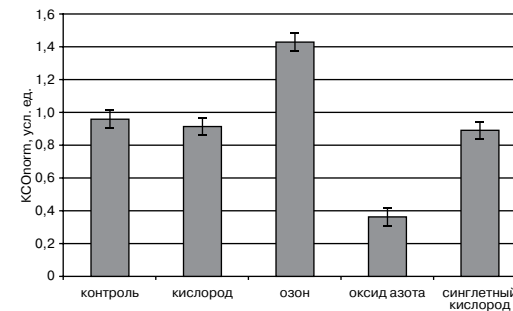


Рис. 3. Влияние источников активных форм кислорода и азота на нормализованный коэффициент субстратного обеспечения (КСОnorm) крови.

контролируемый по значению параметра интактной крови, достигался в случаях обработки биологической жидкости озono-кислородной смесью и синглетным кислородом (125 и 132% от нормы). В условиях относительной гиперлактатемии при применении этих воздействий данная тенденция, по нашему мнению, является позитивной и отображает хорошую субстратную обеспеченность рассматриваемого фермента-компонента энергетического обмена (рис. 2). Оксигенация цельной крови, стимулируя активность ЛДГ в прямой реакции при неизменном уровне лактата в плазме и эритроцитах, приводит к более значимому нарастанию КСО. Это косвенно указывает на интенсификацию кислородзависимых процессов, которая может сопровождаться активацией липопероксидации в клеточных пулах крови.

Введение в цельную кровь монооксида азота, в отличие от активных форм кислорода, оказывая прогипоксический эффект, ингибирует активность ЛДГ в прямой реакции, выраженно стимулируя обратную реакцию фермента. О дисбалансе изучаемой биосистемы дополнительно свидетельствует нарастание лактата в эритроцитах при нитроксилировании

консервированной крови, указывая на формирующийся в созданных условиях энергодефицит.

Наиболее четко рассмотренные тенденции визуализируются при подсчете нормализованного коэффициента субстратного обеспечения, учитывающего не только текущее соотношение компонентов энергетического метаболизма в биологической системе, подвергшейся воздействию физического агента, но и физиологическую активность ЛДГ в прямой и обратной реакциях, а также уровень лактата в интактном образце крови (рис. 3).

Заключение

Таким образом, барботирование консервированной крови кислородом, озono-кислородной смесью и синглетным кислородом благоприятно стимулирует энергетические резервы биосреды. Напротив, нитроксилирование потоком, генерируемым аппаратом «Плазон», угнетает их, что связано с поступлением в биологическую жидкость достаточно высоких концентраций оксида азота и активных форм кислорода.

Список литературы

1. **Анохин П.К.** Теория функциональной системы как предпосылка к построению физиологической кибернетики // Сб. «Избранные труды. Кибернетика функциональных систем». М.: Медицина. 1998. С. 12-86.
2. **Граник В.Г., Григорьев Н.Б.** Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. М.: Вузовская книга. 2004.
3. **Костюк В.А., Потапович А.И.** Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск: БГУ. 2004.
4. **Мартусевич А.А., Перетягин С.П., Мартусевич А.К.** Молекулярные и клеточные механизмы действия син-



- глетного кислорода на биосистемы // Современные технологии в медицине. 2012. № 2. С. 128-134.
5. **Мартусевич А.К., Камакин Н.Ф., Иванникова Е.В., Жукова Н.Э.** Характер действия физико-химических факторов на особенности структуризации сыворотки крови человека *in vitro* // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2012. Вып. 43. С. 112-115.
 6. **Меньщикова Е.Б. с соавт.** Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА. 2008.
 7. **Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С.** Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1998.
 8. Синглетно-кислородная терапия. Научно-методическое пособие / Под ред. И.З. Самосюк, Л.И. Фисенко. Киев. 2007.
 9. **Соловьева А.Г., Зимин Ю.В.** Новый способ оценки динамики метаболизма крови у больных и термической травмой // Современные технологии в медицине. 2012. № 2. С. 116-117.
 10. **Судаков К.В. с соавт.** Нормальная физиология. Курс физиологии функциональных систем. М.: «Медицинское информационное агенство», 1999.
 11. **Узденский А.Б.** Клеточные-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. М.: Наука. 2010.
 12. Nitric Oxide. Basic Research and Clinical Application / Ed. R.J. Gryglewsky, P. Minuz. Amsterdam; Berlin; Oxford; Tokyo; Washington: IOS Press. DC. 2001.

Estimation of some physical agents action on energy metabolism of human blood *in vitro*

A.K. Martusevich, A.G. Soloveva, S.P. Peretyagin, V.N. Mitrofanov

We tested action of oxygen, ozone (500 mcg/l), nitric oxide (800 mcg/l) and singlet oxygen on human blood specimens *in vitro*. Estimated parameters were lactate dehydrogenase activity, blood lactate and some special coefficients. It was stated, that blood oxygenation, ozonation or processing by singlet oxygen stimulated energy reserves, and nitroxilation depressed it.

Key words: reactive oxygen species, nitric oxide, oxidoreductases, blood lactate.

Значение гена раннего реагирования *c-fos* и продуктов его экспрессии в нейронах при различных воздействиях

С.Л. Кузнецов, М.А. Афанасьев

ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздравсоцразвития России, Москва

Контактная информация: Афанасьев Максим Александрович, am-mma@mail.ru

В статье обобщён материал исследований по изучению экспрессии гена раннего реагирования *c-fos* в клетках нервной системы и белков *c-fos*, синтез которых он инициирует в различных условиях эксперимента. Показано, в частности, участие гена и его продуктов в физиологических и патологических процессах, протекающих в отдельных структурах нервной системы.

Ключевые слова: гены раннего реагирования, мРНК *c-fos*, *c-fos*-белки, нейроапоптоз.

Активация генов раннего реагирования – один из механизмов регуляции процесса апоптоза в нервной системе. В свою очередь, нейроапоптоз как патобиохимический процесс лежит в основе многих нейродегенеративных расстройств и проявлений повреждающего влияния на нервную ткань ишемической и/или травматической природы.

Первичная реакция нейрона на апоптическое воздействие, возможно, реализуется именно генами раннего реагирования, такими как *c-fos*, *c-jun* и др. Инициирование их может рассматриваться в качестве эволюционно закреплённого механизма в ответ на повреждение. Следует отметить, что мощным (хотя и не единственным; известны, в частности, белки p53, Rb и др.) ингибитором транскрипции гена *c-fos* служит продукт его экспрессии – белок *c-fos* [31]. Это ингибирование определяется, как предполагается, сывороточным

элементом SRE [22, 30]. Известно, что *Fos*-белок содержит обогащённый положительно заряженными аминокислотами ДНК-связывающий регион и прилежащий к нему домен «лейциновой молнии», необходимый для димеризации с белками *jun*-семейства с образованием активного AP-1 фактора [9, 20].

Изучение экспрессии *c-fos* белков всё больше и больше используется в качестве средства для идентификации функциональности нервных клеток, которые являются частью специфических проводящих путей в нервной системе. Подавляющее большинство экспериментов при этом было проведено на крысах. Одним из первых, кто изучал содержание данных белков, был Е. Булитт (Е. Bullitt). В своих экспериментах он показал, что *c-fos* белки могут применяться в качестве трансинаптических маркёров нейрональной передачи импульса после стимуляции

средством для анестезии, но экспрессия этих белков выражено отмечалась лишь в некоторых типах нейронов, что может говорить о неполной индикации болевого ответа [12]. Кроме того, им же была продемонстрирована экспрессия *c-fos* рядом нейронов в отсутствие стимуляции анестезирующим веществом [13].

Другим автором в это же время показана универсальность гена *c-fos*, т.е. способность к активации в самых разных отделах центральной нервной системы [32].

Группой авторов под руководством Е.А. Корневой была выявлена определённая закономерность экспрессии *c-fos* мРНК в клетках в переднем, паравентрикулярном, дорзомедиальном и вентромедиальном ядрах гипоталамуса после внутривенного введения антигена – столбнячного анатоксина [3, 4], а также бычьего сывороточного альбумина и липополисахарида [5]. Полученные экспериментальные данные побудили авторов сделать вывод о тесной взаимосвязи на генном уровне иммунной и нервной систем, определить пространственно-временные характеристики активации структур гипоталамуса, принимающих участие в реализации реакции на антигенный стимул на уровне экспрессии гена немедленного реагирования *c-fos*. В другом исследовании этим же коллективом автором впервые была продемонстрирована индукция синтеза *c-fos* мРНК (двукратное увеличение *c-fos* позитивных нейронов в сравнении с интактным контролем) уже после 4 ч ротационного стресса в клетках стриатума, зрительных бугров, гипоталамуса и моторной зоны коры полушарий [3]. Одновременно с этим, Гаукема (R.P.A. Gauckema) с коллегами установили, что экспериментальное пересечение блуждающего нерва подавляет экспрессию гена *c-fos* в клетках гипоталамуса при парентеральном (внутрибрюшинном)

введении антигена, в то время как внутривенная инъекция антигена на скорость экспрессии практически не влияет [19]. Возможно, это может свидетельствовать о наличии гуморального пути поступления антигенного сигнала к мозгу, и, следовательно, гуморальных мессенджеров – например, интерлейкина-1 β [11].

Немецкими учёными было показано усиление экспрессии *c-fos* в стриатуме, прилежащем ядре, зрительном бугорке и некоторых других структурах головного мозга крыс в ответ на повторное введение морфина и в течение некоторого времени после введения наркотика [18].

Экспрессия *c-fos* белка может быть использована в качестве высокочувствительного транснейронного маркера для изучения нейронной активности спинного мозга, при повреждении головного мозга (например, фокальной ишемией) и при инъекции пероксидазы хрена в качестве ретроградной метки. Данный метод может быть полезен для исследования транснейронного влияния при повреждении кортикоспинального двигательного тракта. На это было впервые указано Ву и Линг (Y.-P. Wu and E.-A. Ling) [36]. В то же время, когда экспрессия *c-fos* в спинномозговых мотонейронах была наибольшей при вызывании транснейронным эффектом после окклюзии средней мозговой артерии, вероятность, что *c-fos* может инициироваться посредством изменения активности задних конечностей после церебрального ишемического инсульта, не исключена.

Су и соавт. (C. J. Su et al.) в своём эксперименте показали, что после 4 недель антиортостатического вывешивания животного происходит увеличение числа *c-fos*-позитивных клеток в висцеральной зоне ствола, особенно в ядре солитарного тракта [35]. Эти нейроны могут быть

вовлечены, по предположению авторов исследования, в процессы адаптации центральной сердечно-сосудистой регуляции во время невесомости.

При терренкуре, как показали исследователи лаборатории Омори (T. Omori et al.), уровень экспрессии *c-fos* в α -мотонейронах, иннервирующих подошвенную мышцу (75%), более значителен, чем в нейронах, иннервирующих КМ (38%), как и ЭМГ-активность этих мышц, что показывает корреляцию между уровнем экспрессии белка *c-fos* и активностью соответствующей мышцы [28]. В другой работе, выполненной группой исследователей из Испании, проводилась оценка постепенной тренировки на изменение нейрональной экспрессии *c-fos* в гипоталамусе (околожелудочковое, супраоптическое и супрахиазматическое ядра). Группы сравнения представляли собой четырёхдневную тренировку в виде бега в колесе и интактный контроль. Через 1 ч после окончания упражнения число *c-fos*-позитивных клеток в супраоптическом и околожелудочковом ядрах оказалось значительно больше в сравнении с контрольной группой и группой суточного посттренировочного восстановления, что, по мнению авторов данной работы, кажется весьма важным для будущих исследований специфических областей мозга, вовлечённых в постепенную физическую тренировку [26].

К.В. Судаковым и соотр. было показано, что у предрасположенных к эмоциональному стрессу животных максимальная экспрессия гена *c-fos* отмечалась в коре полушарий, миндалинах, обонятельных структурах гипоталамуса и стволовом отделе мозга [7, 10]. В свою очередь, у животных, резистентных к эмоциональному стрессу, в аналогичных условиях эксперимента экспрессия данного гена

выявлялась лишь в инфраламбической коре и обонятельных ядрах [8]. Кроме этого, другими авторами было отмечено, что после хронического переменного лёгкого стресса происходит увеличение *c-fos*-позитивных нервных клеток в определённых мозговых структурах, в частности, в области паравентрикулярных ядрах гипоталамуса у обоих полов крыс и в центральной миндалине у самцов [34]. В этом заключается важная роль половой специфичности ответа на стресс и восприимчивость к депрессии. Ранее, М. Палковиц и коллеги (M. Palkovits et al.) выявили разной степени иммунореактивность нейронов стволовой части мозга в ответ на иммобилизационный стресс, боль, вызванную введением формалина, влияние холода, кровотечение и инсулин-вызванную гипогликемию [29]. Наибольшая иммунореактивность при этом отмечалась после 3 ч иммобилизации в нейронах ретикулярной формации, а также катехоламинергических (тирозин-гидроксилазных) нервных клетках и клетках покрышечного ядра моста. Полученные факты приводят авторов к выводу о специфическом влиянии стрессоров на определённые нейронные проводящие пути центральной организации, участвующие в данном ответе. Наконец, исследователями из Канады также, с использованием иммуногистохимических методов окраски нейронов ядер гипоталамуса, показаны различные реакции на иммобилизационный и реальный полётный стрессоры, выделяя, тем самым, разные функциональные типы клеток паравентрикулярных ядер, говоря о дифференцировке процессов для небольших нейронных «возбудителей» [17].

Имуногистохимическое маркирование нейронов спинного мозга на наличие *c-fos* белков позволяет установить принадлежность реактивных клеток к той

или иной популяции (напр., премоторных промежуточных мотонейронов, вовлечённых в производство локомоций), а также установить их локализацию (пластины Рекседа) [16].

Для определения изменения нейрональной импульсации спинного мозга, идущей по афферентным путям от мышечных веретён, происходящей во время имитируемой гравитационной разгрузки и на разных сроках после неё, а также в сочетании их с высокочастотной электростимуляцией ахиллова сухожилия, Янг и соавт. (W. Yang et al.) использовали определение *c-fos* иммунореактивности данной популяции нейронов [37]. В указанном эксперименте, проведённом на самках крыс линии Sprague-Dawley, имеющих массу 200-250 г, были получены следующие результаты. Двухнедельное антиортостатическое вывешивание ведёт к увеличению общего числа позитивных нейронов. Периодическая стимуляция ахиллова сухожилия или 9-дневный период восстановления после функциональной разгрузки возвращает количество иммунореактивных нервных клеток к норме (интактному контролю). Кроме того, на всём протяжении эксперимента оценивалась локализация меченых клеток в той или иной пластинке спинного мозга. По сравнению с данными, полученными этой группой учёных, в нашем исследовании, проведённом на половозрелых крысах-самцах линии Wistar, не отмечалось какой-либо достоверной динамики *c-fos* иммунореактивных мотонейронов ни при антиортостатическом вывешивании, ни по окончании недельного периода реадaptации [2]. Различия в полученных результатах, на наш взгляд, объясняются, главным образом, тем, что в нашем исследовании анализировалась не вся совокупность мотонейронов, иннервирующих

мышцы задних конечностей, выполняющих в т.ч. противоположные функции, а лишь популяция клеток, участвующих в иннервации двух мышц (передней большеберцовой и камбаловидной).

Ланглет и др. (C. Langlet et al.), используя иммуноцитохимическую методику, показали увеличение количества *c-fos*-позитивных нейронов в первичной и вторичной зонах соматосенсорной коры, а также нейронов спинного мозга в конце двухнедельного периода гиподинамии-гипокинезии [24]. Одновременно с этим авторы обнаружили увеличение числа позитивных по *c-fos* белку клеток в аналогичных анатомических структурах после электрической стимуляции седалищного нерва лабораторного животного. Таким образом, полученные авторами результаты свидетельствуют о более высокой активации корковых нейронов после гиподинамии в сравнении с эффекторными нервными клетками. Это позволяет заключить, что гипокинезия-гиподинамия способствуют возникновению функциональной пластичности.

Кроме того, с использованием иммуногистохимической методики изучалась индукция протоонкогена *c-fos* после 4-часового иммобилизационного стресса. Авторами было продемонстрировано очевидное снижение его экспрессии в клетках переднего и среднего гипофиза на фоне предварительного введения дексаметазона при неизменности экспрессии в околожелудочковом ядре гипоталамуса [23]. В связи с этим, они предположили, что ген *c-fos* вовлекается в регуляцию синтеза разнообразных нейромедиаторов стрессорного ответа (напр., CRF-пептида). При этом сами глюкокортикоидные гормоны не блокируют экспрессию *c-fos*, т.к. дексаметазон не затрагивает индукцию этого гена в околожелудочковом ядре. Сниже-

ние стресс-обусловленной иммунореактивности *c-fos* в гипофизе посредством введения кортикостероидов происходит, возможно, из-за уменьшенной выработки CRF-пептида околожелудочковыми нейронами гипоталамуса.

Регуляция некоторых физиологических функций – ещё одна роль, отводимая раннему гену *c-fos*. Именно поэтому ген *c-fos* стал активно использоваться для картирования головного мозга в качестве биологического зонда [1]. В этой связи было продемонстрировано его участие в познавательных процессах [6, 33]. В более ранней работе [21] сообщалось об экспрессии иммунореактивного белка *c-fos* в ядрах постсинаптических нейронов (наружных слоёв) дорзальных рогов спинного мозга при отсутствии таковых изменений в одиночном ядре и вентральных рогах в ответ на физиологическую стимуляцию первичных чувствительных нейронов, что может свидетельствовать о быстро происходящих изменениях в экспрессии *c-fos* в специфических постсинаптических нейронах.

В одной из недавних работ для *c-fos* была описана более специфичная отсроченная экспрессия, которая чаще связана с развитием патологического процесса, наблюдаемого при повреждающих и стрессорных воздействиях, и может приводить к запуску апоптоза [25].

Интересной представляется работа по исследованию *c-fos* после микроволновой экспозиции. Так, в одном из исследований М. Карбалло-Квинтас с сотр. (M. Carballo-Quintas et al.) [14] была показана увеличенная экспрессия *c-fos* спустя 1,5 ч после воздействия на лабораторных животных 900 мГц в области неокортекса и палеокортекса и крайне низкая – в проекции гиппокампа, что навело учёных на мысль о том, что *c-fos* (а также исследуемые в этом эксперименте

глиальные маркёры) вызваны комбинированным стрессом нетеплового излучения и токсичного эффекта пикротоксина на мозговую ткань.

Т. Огава и др. (T. Ogawa et al.) совсем недавно был предложен новый гистологический подход для оценки функциональных моделей развития, индуцированного пренатальным 5-бromo-2-деоксиуридином [27]. Эта группа исследователей в основу данной модели положила результаты, также полученные с применением иммуногистохимического окрашивания структур головного мозга на *c-fos* белки.

Кроме того, китайские авторы исследовали активацию нейронов стволового отдела мозга (ядро одиночного пути и околоплечевое ядро) после перорального приёма сахарозы (1-я экспериментальная группа) и раствора сахарина (2-я группа). Оказалось, что иммунопозитивные по *c-fos* клетки у животных контрольной группы сконцентрировались, главным образом, в середине околоплечевого ядра и 4-х рострально-каудальных областях ядра одиночного пути. Однако после приёма сахарозы значительно увеличилось количество этих клеток в изучаемых анатомических структурах, а после приёма сахарина отмечалась лишь незначительная тенденция к росту их числа [15]. В итоге предполагается, что околоплечевое ядро и ядро одиночного пути вовлекаются в восприятие сладкого и преобразование сигнала «сладкого потребления» и, в то же время, повышают интенсивность экспрессии *c-fos*, индуцированную сахарозой, существенно чем нейрональная активность упомянутых стволовых ядер, запускающих интегрирование эффектов вкуса сладкого и сигнала, возникающего после глотания.

Резюмируя сказанное, можно заключить, что ген раннего реагирования *c-fos* активируется при самых разнообразных

влияниях на нервную клетку. Эта активация проявляется экспрессией одномоментных белков исключительно на самых начальных этапах воздействия на клетку. Наконец, экспрессия данного гена (точнее, её скорость) непременно приводит к одному из двух путей: либо к апоптозу нейрона, либо к запуску процессов транскрипции, созревания, трансляции и синтеза белков, направленных на мобилизацию адаптационных механизмов.

Список литературы

1. **Анохин К.В.** Принципы и механизмы деятельности мозга человека. Л.: Наука. 1989. С. 191-192.
2. **Афанасьев М.А.** Маркёры функциональной активности мотонейронов и иннервируемых ими волокон мышц-антагонистов крысы на разных сроках периода послеразгрузочного восстановления // Морфологические ведомости. 2012. № 1. С. 19-23.
3. **Барабанова С.В., Головки О.И., Новикова Н.С., Носов М.А., Корнева Е.А., Казакова Т.Б.** Влияние стресса на экспрессию индуцибельных генов *c-fos* и интерлейкина-2 в клетках нервной и иммунной систем // Нейрохимия. 1998. Т. 15 (4). С. 380-384.
4. **Корнева Е.А., Казакова Т.Б., Носов М.А.** Экспрессия *c-fos* мРНК и *c-fos* подобных белков в клетках гипоталамических структур при введении антигена. // Аллергология и иммунология. 2000. Т. 1. № 1. С. 37-44.
5. **Перекрест С.В., Гаврилов Ю.В., Абрамова Т.В., Новикова Н.С., Корнева Е.А.** Активация клеток гипоталамических структур при введении антигенов различной природы (по экспрессии *c-fos* гена) // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8. № 5-6. С. 631-636.
6. **Сварник О.Е.** Формирование индивидуального опыта и его нейрогенетическое обеспечение // Автореф. дисс... канд. психол. наук. 2003. 24 с.
7. **Судаков К.В.** Индивидуальная устойчивость к эмоциональному стрессу. М.: Горизонт. 1998. С. 215-267.
8. **Судаков К.В., Умрюхин П.Е.** Экспрессия гена *c-fos* при эмоциональном стрессе у крыс: эффекты пептида, вызывающего дельта-сон, и фрагмента АКТГ // Известия НАН Беларуси; серия мед.-биол. наук. 2001. № 1. С. 6-14.
9. **Angel P., Karin M.** The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation // *Biochemica et Biophysica Acta*, 1991. Vol. 1072 (2-3), pp. 129-157.
10. **Babaei P., Sudakov K.V.** Stress induced *c-fos* expression in the rat brain is individual-typological dependent // *Pathophysiology abstracts of the III International Congress of pathophysiology*. 1998. Vol. 5. Suppl. 1. P. 221.
11. **Banks W.A., Kastin A.J., Broadwell R.D.** Passage of cytokines across the blood-brain barrier. // *Neuroimmunomodulation*. 1995. Vol. 2. P. 241-248.
12. **Bullitt E.** Expression of *c-fos*-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat // *The Journal of Comparative Neurology*. 1990. Vol. 296. P. 517-530.
13. **Bullitt E., Lee C.L., Light A.R., Willcockson H.** The effect of stimulus duration on noxious-stimulus induced *c-fos* expression in the rodent spinal cord // *Brain Research*. 1992. V. 580(1-2). P. 172-179.
14. **Carballo-Quintás M., Martínez-Silva I., Cadarso-Suárez C., et al.** A study of neurotoxic biomarkers, *c-fos* and GFAP after acute exposure to GSM radiation at 900 MHz in the picotoxin model of rat brains // *Neurotoxicology*. 2011. Vol. 32(4). P. 478-94.
15. **Chen K., Yan J., Li J., et al.** *c-fos* expression in rat brainstem following intake of sucrose or saccharin // *Front Med*. 2011. Vol. 5 (3). P. 294-301.
16. **Dai X., Noga B.R., Douglas J.R., Jordan L.M.** Localization of spinal neurons activated during locomotion using the *c-fos* immunohistochemical method. // *Journal of Neurophysiology*. 2005. Vol. 93(6), P. 3442-3452.
17. **Dumont E. C., Kinkead R., Trotter J. F., Gosselin I., Drolet G.** Effect of chronic psychogenic stress exposure on enkephalin neuronal activity and expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus // *Journal of Neurochemistry*. 2000. Vol. 75 (5). P. 2200-2211.
18. **Erdtmann-Vourliotis M., Mayer P., Linke R., Riechert U., Höllt V.** Long-lasting sensitization towards morphine in motoric and limbic areas as determined by *c-fos* expression in rat brain // *Brain Research Mol Brain Research*. 1999. Vol. 72(1). P. 1-16.
19. **Gaykema R. P. A., Goehler L. I., Tilders J. G. J., McGorry M., Fleshner M., Maier S. F., Watkins L. R.** Bacterial endotoxin induces *fos* immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve // *Neuroimmunomodulation*. 1998. Vol. 5. P. 234 - 240.
20. **Herdegen T, Leah J. D.** Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins // *Brain Research*. 1998. Vol. 28 (3). P. 370-490.
21. **Hunt S.P., Pini A., Evan G.** Induction of *c-fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation // *Nature*. 1987. Vol. 328 (6131). P. 632-634.
22. **Konig H., Ponta H., Rahmsdorf U., Büscher M. et al.** Autoregulation of *fos*: the dyad symmetry element as the major target of repression // *EMBO Journal*. 1989. Vol. 8. P. 2559-2566.
23. **Kononen J., Honkaniemi J., Alho H., Koistinaho J., Iadarola M., Pelto-Huikko M.** Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic-pituitary axis after immobilization stress // *Endocrinology*. 1992. Vol. 130(5). P. 3041-3047.
24. **Langlet C., Canu M.H., Viltart O., Sequeira H., Falempin M.** Hypodynamia-hypokinesia induced variations in expression of *fos* protein in structures related to somatosensory system in the rat // *Brain Research*. 2001. Vol. 29. P. 72-80.
25. **Mohammadi S., Pavlik A., Krajci D., Al-Sarraf H.** NMDA preconditioning and neuroprotection in vivo: delayed onset of kainic acid-induced neurodegeneration and *c-fos* attenuation in CA3a neurons // *Brain Research*. 2009. Vol. 1256. P. 162-172.
26. **Núñez P., Perillan C., Vijande M., Arguelles J.** Progressive training effects on neuronal hypothalamic activation in the rat. // *Neuroscience Letters*. 2012. Vol. 517(2). P. 113-7.
27. **Ogawa T., Kuwagata M., Muneoka K., et al.** Abnormal brain function of the rat neonate in a prenatal 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-induced developmental disorder model // *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2012. Vol. 30(6). P. 507-15.
28. **Omori T., Kawashima H., Kizuka T., Ohiwa N., Tateoka M., Soya H.** Increased *c-fos* gene expression in alpha motoneurons in rat loaded hindlimb muscles with inclined locomotion // *Neuroscience Letters*. 2005. Vol. 389. P. 25-29.
29. **Palkovits M., Baffi J. S., Pacak K.** Stress-induced Fos-like Immunoreactivity in the

- pons and the medulla oblongata of rats // Stress. 1997. Vol. 1 (3). P. 155-168.
30. Pospelova T.V., Volkova I.V., Kukushkin A.N., Svetlikova S.B., Pospelov V.A. The serum element (SRE)--the probable target for the negative control in the regulation of the proto-oncogene c-fos promoter // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1990. Vol. 315. № 4. P. 1003-1010.
31. Sasson-Corsi P., Der C. J., Verma I. M. Ras-induced neuronal differentiation of PC12 cells: possible involvement of fos and jun // Molecular and Cellular Biology. 1989. Vol. 9 (8). P. 3174-3183.
32. Sheng M., Greenberg M.E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system // Neuron. 1990. Vol. 4. P. 477-485.
33. Solov'eva N.A., Lagutina L.V., Antonova L.V., Anokhin K.V. Regulation of c-fos gene expression in the rat olfactory bulb during olfactory learning // Neuroscience Behavioral Physiology. 2007. Vol. 37(7). P. 697-704.
34. Sterrenburg L., Gaszner B., Boerrigter J., et al. Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat // Public Library of Science One. 2011. Vol. 6(11). 28128 p.
35. Su C.J., Bao J.X., Zhang L.F., Rao Z.R. Fos protein expression in the medulla oblongata and changes in size of spinal lateral horn neurons after 4-wk simulated weightlessness in rats // Journal of Gravitational Physiology. 2000. Vol. 7(3). P. 71-78.
36. Wu Y.-P. and Ling E.-A. Expression of Fos in the spinal motoneurons labeled by horseradish peroxidase following middle cerebral artery occlusion in rat // Brain Research. 1998. Vol. 45. P. 571-576.
37. Yang W., Li Fan X., Zhang H., Wu S. D., Song X. A. Effects of hindlimb unloading and reloading on c-fos expression of spinal cord evoked by vibration of rat Achille tendon // Neuroscience Letters. 2008. Vol. 439. P. 1-6.

The values of early response gene *c-fos* and products of its expression in neurons under different treatments

S.L. Kuznetsov, M.A. Afanasyev

In article summarizes the material experimental studies on the early response gene *c-fos* in the cells of the nervous system and protein *c-fos*, which it initiates synthesis of variety experimental conditions. It is shown, in particular, the involvement of gene and its products in the physiological and pathological processes proceeding in the individual structures of nervous system.

Key words: early response genes, *c-fos* mRNA, *c-fos* proteins, neuroapoptosis.

Частота полиморфных маркеров CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 среди русской популяции и сравнение распространенности CYP2C19*2 у пациентов с ишемической болезнью сердца, получающих терапию клопидогрелем, и здоровых добровольцев

К.Б. Мирзаев¹, Д.А. Сычев¹, В.Н. Каркищенко³, А.В. Грачев², Г.П. Князева², Р.Е. Казаков, А.В. Карасёв¹

¹ – Кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва

² – «СМ-клиника», Москва

³ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: д.м.н., профессор Сычев Дмитрий Алексеевич, Dmirty.Alex.Sychev@gmail.com

Одной из широко распространенных причин индивидуальной изменчивости ответа на лекарственную терапию является генетический полиморфизм ферментов биотрансформации – цитохрома P450. Мы обследовали 40 пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), получающих терапию клопидогрелем, и 146 здоровых добровольцев. Носительство полиморфных маркеров CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 определялось методом Real-Time PCR. Среди пациентов: 20 человек имели генотип CYP2C19 *1/*1 (50%), 12 – CYP2C19 *1/*2 (30,0%), 5 – CYP2C19 *1/*17 (12,5%) и 3 – CYP2C19 *17/*17 (7,5%). Генотипы *1/*3, *3/*3 и **2/*2 обнаружены. Среди здоровых людей по CYP2C19*2: 111 имели генотип CYP2C19 *1/*1 (76,1%), 31 – CYP2C19 *1/*2 (21,2%) и 4 – CYP2C19 *2/*2 (2,7%). Частота CYP2C19*2 у пациентов с ИБС и у здоровых добровольцев составила 15,0% и 13,3% соответственно ($p=0,323$). Полученные данные могут быть полезны для разработки рекомендаций по персонализированной антиагрегантной терапии у российских пациентов с ИБС.

Ключевые слова: CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17, клопидогрел, фармакогенетика.

Введение

Одной из широко распространенных причин индивидуальной изменчивости ответа на лекарственную терапию является генетический полиморфизм ферментов биотрансформации – цитохрома P450. Цитохром P450C19 (CYP2C19) – изофермент, ответственный за метаболизм ряда лекарственных препаратов, в том числе барбитуратов, диазепамы, лансопразола, фенитоина, клопидогрела, омепразола, прогупанила и пропранолола [1]. Клопидогрел является пролекарством, требующим биоактивации для оказания

антитромбоцитарного эффекта. После абсорбции ~85% препарата превращается в неактивный метаболит – SR 26334 под воздействием карбоксилэстеразы-1. Оставшиеся ~15% подвергаются двухэтапной биотрансформации в печени при участии изоферментов системы цитохромов P-450. На первом этапе образуется 2-оксо-клопидогрел, на втором этапе – активный метаболит-R130964. Наибольший вклад в метаболизм клопидогрела в печени вносит изофермент CYP2C19. Известно 25 полиморфных вариантов одноименного гена CYP2C19, кодирующего

Таблица 1

Частота аллелей CYP2C19*1, CYP2C19*2, CYP2C19*17 среди пациентов и здоровых добровольцев российской популяции

Группы	N	% носители *2 (*1/*2 + *2/*2)	Аллели CYP2C19		
			*1	*2	*17
Пациенты	40	30,0	0,71	0,15	0,14
Здоровые	146	23,9	0,87	0,13	ND ¹

¹ – аллельный вариант *17 среди здоровых добровольцев не определялся.

изофермент CYP2C19. Носительство аллельного варианта CYP2C19*1 обеспечивает полную ферментативную активность CYP2C19 и, соответственно, нормальный метаболизм клопидогрела. CYP2C19*2 и CYP2C19*3 ассоциированы со снижением ферментативной активности цитохромов печени и возникновением резистентности к клопидогрелу, которая клинически проявляется повторным инфарктом миокарда, инсультом, тромбозом стента. Существуют межэтнические различия в распределении CYP2C19*2: около 50% китайцев, 34% афроамериканцев, 18% европейцев и 19% американцев мексиканского происхождения [2, 3, 4, 5]. У носителей аллели CYP2C19*17 отмечается повышение ферментативной активности CYP2C19 и повышенный риск кровотечений при применении стандартной дозы клопидогрела [6]. Влияние полиморфизма гена CYP2C19 на терапию клопидогрелем было доказано в нескольких исследованиях [7, 2, 8, 9, 10]. В 2011 г. в руководство Европейского Общества Кардиологов (ESC) по лечению пациентов с острым коронарным синдромом было включено фармакогенетическое тестирование с целью выбора антиагрегантного препа-

рата (уровень доказательности II B) [11]. Согласно рекомендациям Американской Ассоциации Сердца (AHA)/Американской коллегии кардиологов (ACC), в фармакогенетическом тестировании нуждаются преимущественно пациенты из группы риска развития тромбоза стента (уровень доказательности III C) [12]. Несмотря на доказанную эффективность, имеется ряд проблем при применении клопидогрела в рекомендованной дозе: относительно высокая частота резистентности к терапии в некоторых этнических группах, клинически проявляющаяся повторными тромбозами, инфарктами и инсультами, и возникновение побочных эффектов в виде кровотечения, при назначении в стандартной дозе [13].

Цель работы: определить распространенность полиморфных маркеров CYP2C19*2, CYP2C19*3 и CYP2C19*17 в российской популяции. Сравнить распространенность генотипов и аллелей по CYP2C19*2 у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), принимающих клопидогрел для вторичной профилактики сердечно-сосудистых осложнений, и здоровых добровольцев из российской популяции.

Материалы и методы

В исследование было включено 40 пациентов (17 женщин и 23 мужчины, средний возраст 62±10 лет) с ИБС, получающих терапию клопидогрелем, и 146 здоровых добровольцев (38 женщин и 108 мужчин, средний возраст 38,1 ± 10,1 лет) из российской популяции. Письменное информированное согласие было получено от всех участников.

Генотипирование: 4 мл венозной крови было собрано в пробирки, содержащие ЭДТА. Лейкоциты периферической крови отделяли центрифугированием. ДНК выделяли из лейкоцитов крови стандартным фенол-хлороформным методом. Частоты полиморфизмов CYP2C19*2 (с.G681A; rs4244285), CYP2C19*3 (с.636G>; rs4986893) и CYP2C19*17 (с.C806T; rs12248560) были определены с использованием полимеразной цепной реакции в

реальном времени (Real-Time PCR). Программа включала предварительную денатурацию при 95°C в течение 10 мин, затем 30 циклов: денатурация при 95°C в течение 30 с, отжиг при 60°C в течение 60 с и удлинение при 72°C в течение 60 с, и последний этап – удлинение при 72°C в течение 7 мин. Носители генотипа *1/*1 обозначаются как «extensive metabolizer», носители двух аллелей CYP2C19*2 или CYP2C19*3 (*2/*2, *2/*3, *3/*3) обозначаются как «poor metabolizers» (PM), одной аллели (*1/*2, *1/*3, *2/*17, *3/*17) обозначаются как «intermediate metabolizers» (IM). Носители аллели CYP2C19*17 (*1/*17, *17/*17) обозначаются как «ultrarapid metabolizer» (UM).

Статистические методы: точный критерий Фишера был использован для сравнения различий в распределении генотипов и аллелей между пациентами и здоровыми

Таблица 2

Частота генотипов среди пациентов и здоровых добровольцев русской популяции

Генотип	Число (% от общего кол-ва)		
	Пациенты (n=40)	Здоровые (n=146)	
EM ¹	*1/*1	20 (50,0)	111 (76,1)
IM	*1/*2	12 (30,0)	31 (21,2)
	*1/*3	0	ND ²
PM	*2/17	0	ND
	*3/*17	0	ND
	*2/*2	0	4 (2,7)
UM	*2/*3	0	ND
	*3/*3	0	ND
	*1/*17	7 (12,5)	ND
	17/*17	3 (7,5)	ND

¹ – EM: extensive metabolizer; IM: intermediate metabolizer; PM: poor metabolizer; UM: ultrarapid metabolizer.

² – данные аллельные варианты среди здоровых не определялись.

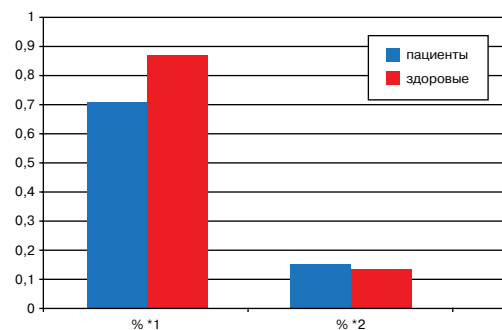


Рис. 1. Частота аллели CYP2C19*2 среди пациентов и здоровых добровольцев российской популяции ($p=0,323$).

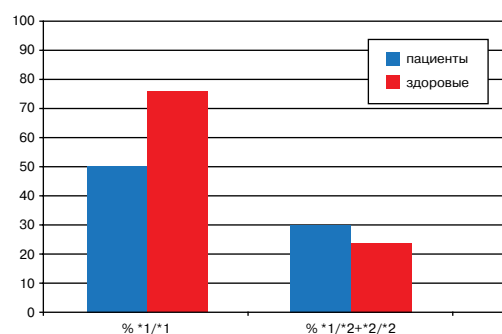


Рис. 2. Частота генотипов CYP2C19 среди пациентов и здоровых добровольцев российской популяции ($p=0,125$).

добровольцами. Хи-квадрат был использован для сравнения наблюдаемого числа каждого генотипа с ожидаемыми для популяции, в соответствии с законом Харди-Вайнберга. Для всех тестов $p < 0,05$ считали статистически значимым. Обработка результатов проводилась в SPSS 20.

Результаты исследований

При генотипировании среди пациентов: 20 человек имели генотип CYP2C19*1/*1 (50%), 12 – генотип CYP2C19*1/*2 (30,0%), 5 – генотип CYP2C19*1/*17 (12,5%) и 3 – генотип CYP2C19*17/*17 (7,5%). Аллель CYP2C19*3 и генотип CYP2C19*2/*2 не выявлены. Частота генотипов среди здоровых добровольцев по CYP2C19*2: 11

имели генотип CYP2C19*1/*1 (76,1%), 31 – генотип CYP2C19*1/*2 (21,2%) и у 4 выявили генотип CYP2C19*2/*2 (2,7%) (табл. 1, 2). Никаких существенных отклонений от равновесия Харди-Вайнберга не наблюдалось (пациенты: CYP2C19*2-X2=0,235, $p=0,628$ и CYP2C19*17-X2=0,051, $p=0,822$; здоровые добровольцы: CYP2C19*2-X2=0,107, $p=0,743$). Выявленные различия между группами статистически незначимы ($p=0,125$) (рис. 1, 2).

Обсуждение результатов

В данном исследовании мы получили результаты, близкие к полученным Gaikovitch [14] в исследовании среди здоровых добровольцев из российской популяции. Так, чистота носительства CYP2C19*2 среди здоровых добровольцев в нашем и предыдущем исследовании составила 13,3% и 11,4% соответственно ($p=0,153$). Данные, полученные нами среди пациентов (CYP2C19*2 – 15,0%), имеющих ИБС, также близки к результатам, полученным Komarov A.L., CYP2C19*2 – 14,5% ($p=0,147$) [14], и Galiavich A.S., CYP2C19*2 – 12,5% ($p=0,297$), среди больных российской популяции, страдающих ИБС [16]. Частота CYP2C19*2 в данном исследовании оказалась выше у пациентов с ИБС по сравнению со здоровыми добровольцами – 15,0% и 13,3% соответственно ($p=0,323$). Распространенность носительства, по крайней мере, одной мутантной аллели CYP2C19*2 (*1/*2 + *2/*2), ассоциированной с резистентностью к клопидогрелу, среди пациентов и здоровых добровольцев составили 30% и 23,9% соответственно ($p=0,125$). Другими словами, почти у каждого третьего пациента мы можем ожидать недостаточную эффективность терапии клопидогрелом при назначении его в стандартной дозе. То, что мы не обнаружили генотипы *2/*2, *1/*3 и

*3/*3, не является необычным, так как они редко встречаются во многих этнических группах, и доля пациентов, которые являются носителями, по крайней мере, одной аллели CYP2C19*3 среди европейцев, африканцев и азиатов, составляют <1%, <1% и 7% соответственно [17].

Выводы

Полученные в нашем исследовании данные по частоте носительства полиморфных маркеров CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 среди российских пациентов с ИБС, принимающих клопидогрел, могут быть полезны для разработки рекомендаций по персонализированной антиагрегантной терапии и стратификации риска тромбозов и кровотечений на основе фармакогенетического тестирования.

Ограничения

К недостаткам нашего исследования можно отнести небольшое количество пациентов, включенных в исследование, а также то, что аллели CYP2C19*3 и CYP2C19*17 не определялись у здоровых добровольцев. В дальнейшем планируется увеличить количество пациентов и отследить сердечно-сосудистые осложнения, наблюдаемые на фоне терапии клопидогрелом.

Список литературы

1. Goldstein, J.A. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. Br. J. Clin. Pharmacol. 2001. 52: 349-355.
2. Mega J.L., Close S.L., Wiviott S.D., Shen L., Hockett R.D., Brandt J.T., et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. N Engl J Med. 2009 Jan 22;360(4):354-62. Epub. 2008. Dec 22.

3. H.R. Luo, R.E. Poland, K.M. Lin, et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in Mexican Americans: a cross-ethnic comparative study. Clin. Pharmacol Ther. 80 (2006). P. 33-40.
4. Giusti B., Gori A.M., Marcucci R., Saracini C., Sestini I., Paniccia R., et al. Relation of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism to occurrence of drug-eluting coronary stent thrombosis. Am J. Cardiol. 2009 Mar 15;103(6):806-11. Epub 2009. Jan 24.
5. Bonello L., Armero S., Ait Mokhtar O., Mancini J., Aldebert P., Saut N., et al. Clopidogrel loading dose adjustment according to platelet reactivity monitoring in patients carrying the 2C19*2 loss of function polymorphism. J Am Coll Cardiol. 2010. Nov 9;56(20):1630-6.
6. Sibbing D., Koch W., Gebhard D., et al. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. Circulation. 2010. 121:512-518.
7. Trenk D., Hochholzer W., Fromm M.F., et al. Cytochrome P450 2C19 681G >A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. J. Am Coll Cardiol. 2008. 51:1925-1934.
8. Shuldiner A.R., O'Connell J.R., Gurbel P.A., et al. Influence of CYP2C19 polymorphism on antiplatelet effects of clopidogrel and long-term recurrent ischemic event occurrence. JAMA, 302 (2009), P. 849-858.
9. Simon T., Verstuyft C., Mary-Krause M., Quteineh L., Drouet E., Meneveau N., et

- al.* Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009. 360(4):363-375.
10. *Sibbing D., Stegherr J., Latz W., et al.* Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention *Eur Heart J*, 30 (2009), P. 916-922.
11. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2011. Sep 21.
12. ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention. *JACC*. 2011. V.58(24). P.44-122.
13. *Angiolillo D.J., Fernandez-Ortiz A., Bernardo E., et al.* Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2007. 49(14):1505-1516.
14. *Komarov A.L., Panchenko E.P., Donnikov A.E., Shakhmatova O.O., Dzhililova G.V., Iliushchenko T.A.* Factors determining clinical effectiveness of clopidogrel and prognosis of patients with stable ischemic heart disease. *Kardiologiya*. 2011. 51(2):8-18.
15. *Gaikovitch E.A., Cascorbi I., Mrozkiewicz P.M., Brockmüller J., Frötschl R., Köpke K., et al.* Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J. Clin. Pharmacol*. 2003. Aug;59(4):303-12. Epub 2003. Jul 15.
16. *Galiavich A.S., Valeeva D.D., Minnetdinov R.Sh., Arkhipova A.A., Akhmetov I.I., Galiavi R.A.* CYP2C19 gene polymorphism in patients with myocardial infarction who use clopidogrel. *Kardiologiya*. 2012. 52(4):20-4.
17. *Collet J.P., Hulot J.S., Pena A., et al.* Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet*. 2009. 373:309-317.

CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 allele and genotype frequencies in clopidogrel-treated patients with coronary heart disease from the Russian population

K.B. Mirzaev, D.A. Sychev, V.N. Karkischenko, A.V. Grachev, G.P. Knyazev, R.E. Kazakov, A.V. Korasev

Individual variation in the response to drug therapy has been mainly attributed to the genetic polymorphism of cytochrome P 450 isoenzymes. We examined 40 patients with CHD, who received clopidogrel and 146 healthy volunteers. CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 carriage was determined by a polymerase chain reaction. 20 clopidogrel-treated patients had the CYP2C19 *1/*1 genotype (50%), 12 – CYP2C19 *1/*2 (30,0%), 5 – CYP2C19 *1/*17 (12,5%), and 3 – CYP2C19 *17/*17 (7,5%). Among the healthy volunteers, 111–CYP2C19 *1/*1 (76,1%), 31 – CYP2C19 *1/*2 (21, 2%), and 4 – CYP2C19*2/*2 (2,7%). The frequencies of CYP2C19*2 were 15,0% and 13,3% in patients with CHD and in healthy volunteers respectively (p=0,323). The results of the present study show the impact of individual response variability to clopidogrel on clinical outcomes and may be helpful in developing current and future directions for its management.

Key words: CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17, clopidogrel, pharmacogenetics.

Генетические предикторы лекарственной аллергии на бета-лактамы антибиотиков

И.Е. Грознова¹, Д.А. Сычев², Н.Г. Бердникова¹, А.О. Чикало¹

¹ – ФГБУН «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения России, Москва

² – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: д.м.н., профессор Сычев Дмитрий Алексеевич, Dmirty.Alex.Sychev@gmail.com

В современной клинической практике наблюдается существенный рост использования антибактериальных препаратов для лечения больных с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями. Бета-лактамы антибиотиков являются одними из наиболее клинически значимых антибактериальных препаратов, используемых в медицине. Несмотря на высокую эффективность в лечении многих инфекционно-воспалительных заболеваний, сфера применения бета-лактамов антибиотиков значительно ограничивается побочными реакциями, возникающими на фоне лечения с использованием этих препаратов. Наиболее частыми из них в клинической практике являются аллергические реакции. Бета-лактамы антибиотиков относятся к лекарственным препаратам, на которые чаще всего развиваются IgE- опосредованные аллергические реакции. В настоящее время для прогнозирования подобного рода побочных реакций проводятся многочисленные исследования по поиску генов-кандидатов, вовлеченных в развитие аллергических реакций на бета-лактамы антибиотиков. В настоящей статье рассматриваются частота и структура побочных реакций аллергического генеза на бета-лактамы антибиотиков, патогенез аллергической реакции, а также стратегии поиска потенциальных генетических предикторов.

Ключевые слова: бета-лактамы антибиотиков, побочные реакции, генетические предикторы.

С учетом высокой клинической эффективности и низкой токсичности, бета-лактамы антибиотиков составляют основу современной противомикробной терапии, занимая основное место при лечении больных с различными бактериальными инфекциями [7]. Однако бета-лактамы антибиотиков могут принести не только пользу, но и вред, т.к. в ряде случаев наблюдаются побочные реакции, возникающие на фоне применения данных препаратов [8]. Наиболее частыми из них в клинической практике являются аллергические реакции. Аллергические реакции чаще отмечаются при применении пенициллинов (5–10%), реже – цефалоспоринов (2%), карбапенемов и монобактамов (менее 1%).

Так, по результатам недавно проведенных клинических исследований цефалоспоринов III фазы, частота развития аллергических реакций, в том числе реакций гиперчувствительности немедленного типа, составила более 3% [17, 19]. К числу нечастых, но серьезных побочных реакций, возникающих при применении цефалоспоринов, относятся аллергические реакции, варьирующие по степени тяжести от обширных кожных высыпаний до угрожающих жизни явлений, таких как бронхоспазм и анафилактический шок [19].

В целом, клинические проявления аллергических реакций на антибиотики чрезвычайно разнообразны по симптоматике, тяжести течения и тропности к различным

органам и системам, что зависит от вида антибиотика, заболевания, по поводу которого он назначается, и иммунологического состояния больного [12].

Наиболее частыми аллергическими реакциями на бета-лактамы являются кожные проявления — макулопапулезная сыпь, крапивница и кожный зуд. Эти реакции развиваются, как правило, через несколько дней или недель после начала приема препарата, в течение которых происходит сенсibilизация организма. В случаях повторного контакта с лекарством характерно более быстрое возникновение аллергической реакции, иногда в течение нескольких часов или даже минут [18].

Наши исследования направлены на поиск генетических предикторов развития реакций гиперчувствительности, вызванных применением бета-лактамов антибиотиков.

В качестве потенциальных мишеней мы рассматриваем полиморфизмы (ввиду относительной лёгкости их обнаружения) генов, отвечающих за функционирование элементов иммунной системы, которые и формируют аллергическую реакцию. Генетическим исследованиям во многом способствует детальное описание патогенеза аллергических реакций. Зная молекулярные механизмы формирования данных реакций, можно наметить гены, белковые продукты которых имеют в этом наибольшее значение. Такие гены будут являться «кандидатами» на роль генов подверженности к их развитию.

Механизм развития и виды аллергических реакций

Аллергия на антибиотики является одним из видов лекарственной аллергии. Главным патогенетическим механизмом лекарственной аллергии является повышенная иммунологическая реактивность

(гиперчувствительность), выражающаяся в гиперпродукции отдельных факторов системы иммунитета: антител определенных классов (нередко IgE), сенсibilизированных Т-лимфоцитов, интерлейкинов и других медиаторов, выделяемых лейкоцитами.

Аллергии на лекарства всегда предшествует период сенсibilизации, когда происходит первичный контакт иммунной системы организма и лекарства. Этот период характеризуется развитием обычного иммунного ответа, в процессе которого формируются антитела различных классов и/или сенсibilизированные Т-клетки, определяющие в последующем специфичность аллергической реакции [4]. Аллергическая реакция на лекарства, как и на другие аллергены, всегда является вторичной иммунной реакцией и развивается уже в сенсibilизированном организме на повторный (третичный и т.д.) контакт с соответствующим препаратом. Степень сенсibilизации при новых контактах увеличивается в связи с нарастанием уровня антител и (или) клеточной сенсibilизации. Возникшая сенсibilизация к лекарству-аллергену разрешается при участии антител: повышенными реакциями немедленного или иммунных Т-лимфоцитов — реакциями замедленного типов [2, 3].

Кумбсом и Джеллом (Coombs, Gell) выделены четыре типа реакций гиперчувствительности: I — IgE-опосредованные (анафилактические), II — цитотоксические, III — иммунокомплексные, IV — клеточно-опосредованные, или замедленные. Реакции первых трех типов опосредуются антителами; реакции четвертого — преимущественно Т-клетками и макрофагами [5].

Гиперчувствительность немедленного типа развивается следующим образом: аллергены проникают через слизистые оболочки в организм и поглощаются антигенпрезентирующими клетками (В-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки), которые

осуществляют их переваривание (процессинг). В результате переваривания под влиянием лизосомальных ферментов из аллергенов образуется определенное количество пептидов, которые загружаются в пептидсвязывающие бороздки молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС), транспортируются на поверхность антигенпрезентирующих клеток и презентуются для распознавания Т-лимфоцитам-хелперам. Аллергенные пептиды распознаются Т-хелперами типа 2, которые в момент распознавания активируются и продуцируют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-3 и другие цитокины. Под влиянием ИЛ-4 и при условии наличия костимуляционного сигнала в виде контакта двух молекул CD40 и CD40L В-лимфоцит превращается в плазматическую клетку, которая продуцирует преимущественно IgE; под влиянием ИЛ-4, ИЛ-3 усиливается пролиферация базофилов обоих типов и увеличивается на их поверхности количество рецепторов к Fc-фрагменту IgE [8]. Антитела IgE связываются с Fc-рецепторами тучных клеток, тем самым сенсibilизируя их. При повторной встрече аллергена с сенсibilизированной тучной клеткой он перекрестно связывается с фиксированными на ее поверхности IgE, что приводит к повышению внутриклеточной концентрации Ca²⁺. В результате клетка выделяет ранее синтезированные медиаторы, такие как гистамин и протеазы, а также новосинтезированные медиаторы липидной природы — лейкотриены и простагландины [5].

Выделение биологически активных веществ при дегрануляции приводит к активации тромбоцитов с выделением серотонина; активации гемостаза; выделению гистамина и повышению проницаемости сосудов; усилению сокращения гладкой (неисчерченной) мышечной ткани под влиянием лейкотриенов и простагландинов и др. Все это обеспечивает развитие острой фазы реакции

и ее клинических симптомов, которыми являются чихание, бронхоспазм, зуд и слезотечение. Из эозинофилов выделяются медиаторы, к которым относятся главный основной белок эозинофилов, катионные белки, пероксидаза, нейротоксин, тромбоцитарноактивирующий фактор, лейкотриены и др. Под влиянием этих медиаторов развиваются симптомы поздней фазы, которые характеризуются развитием клеточного воспаления, разрушением эпителия, гиперсекрецией слизи, сокращением бронхов [1, 9].

Гиперчувствительность II типа, называемая также антителозависимой цитотоксической, возникает, когда антитела, обычно класса IgG, связываются на поверхности клеток с ауто- или чужеродным антигеном, вызывая в результате фагоцитоз, активацию киллерных клеток или комплемент-опосредованный лизис.

Гиперчувствительность III типа развивается при образовании большого количества иммунных комплексов или при нарушении их элиминации ретикулоэндотелиальной системой; обе эти причины вызывают реакции наподобие сывороточной болезни.

Гиперчувствительность IV, или замедленного типа наиболее резко проявляется в тех случаях, когда макрофаги поглощают чужеродный материал, но не способны его элиминировать. При этом происходит стимуляция синтеза Т-клетками цитокинов, вызывающих различные воспалительные реакции [5].

Гены-кандидаты, вовлеченные в развитие аллергических реакций

Возникновение лекарственной аллергии — многофакторный процесс, зависящий от генной предрасположенности, реализуемой на уровне HLA-генов (отвечают за формирование антигенпредставляющей системы) и рецепторов клеток системы иммунитета.

Таблица 1

Цитокины, участвующие в патогенезе аллергических реакций [8]

Цитокины	Рецептор	Источник	Цель	Основная функция	Ассоциация с болезнью
IL-4	IL4R α и IL2R γ или IL4R α и IL13R	T-клетки, тучная клетка	T-клетки, В-клетки, макрофаги, моноциты	Пролиферация и дифференцирование TH-2 клеток. Усиливает выработку IgG и IgE; ингибирует клеточный иммунитет и развитие TH 17 клеток	↓ = восприимчивость к внеклеточным патогенным микроорганизмам и уменьшение реакции на аллергены ↑ = аллергическая астма
IL-5	IL5R α и β c	T-хелперы 2	Эозинофилы, В-клетки	Пролиферация и активация; отличительная особенность эффекторных TH-2 клеток	↓ = дефицит эозинофилов и В-1 клеток. ↑ = аллергическая астма
IL-10	IL10R1 и IL10R2	Дифференцированные T-хелперные клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие	Макрофаги, T-клетки, дендритные клетки, В-клетки	Подавление иммунитета; снижает представление антигена и экспрессию MHC II дендритными клетками, уменьшает количество патогенных TH-1, TH-2, и ответы TH-17	↓ иммунная патология вследствие неконтролируемого воспалительного процесса. ↑ = ингибирует стерильный иммунитет к некоторым патогенам
IL-13	IL13R и IL4R α	T-клетки	В-клетки, макрофаги и другие	Активация бокаловидных клеток в легких и кишечнике; способствует производству IgE, регулирование клеточного иммунитета	↓ = нарушение TH-2 ответа на внеклеточные патогенные микроорганизмы и аллергены. ↑ = обостряет заболевания дыхательных путей
IL-31	IL31R α и OSM-R β	Активированные T-клетки	Миелоидные предшественники, клетки эпителия лёгких, кератиноциты	Провоспаление	↑ = атопический дерматит; аллергическая астма
IL-33	ST2 и IL1R-ACp	Макрофаги, дендритные клетки	Тучные клетки, TH-2 клетки	способствует производству цитокинов TH-2 клетками	↑ = атопический дерматит, аллергическая астма

Примечание: IL – интерлейкин, R – рецептор, β c (beta chain) – бета-цепь (и, соответственно, альфа-цепь или гамма-цепь), AcP - (accessory protein) вспомогательный белок, TH – T хелперные клетки, ↑ - усиленная экспрессия, ↓ - ослабленная экспрессия.

Гены, ответственные за развитие атопии и аллергических реакций, локализируются в 5-й и 11-й хромосомах. Они определяют синтез цитокинов, участвующих в аллергических реакциях. В первую очередь, нас интересуют полиморфизмы данных генов (функции которых уже известны и отражены в NCBI), в том числе полиморфизмы генов интерлейкинов, которые обеспечивают взаимодействие между элементами иммунной системы (главным образом, между T-клетками и В-клетками). Причём важны не только гены, кодирующие эти молеку-

лы, но и гены, кодирующие рецепторы для их распознавания и сигнализации (наиболее интересные для дальнейшего изучения интерлейкины приведены в табл. 1) [8]. Также полиморфизмы генов, которые отвечают за выработку, стимуляцию выработки и узнавания IgE (гены, кодирующие Fc ϵ -рецепторы).

Генетические факторы, влияющие на IgE-опосредованные механизмы, были изучены, в основном, при применении бета-лактамов антибиотиков [13]. Например, полиморфизмы гена, кодирующего α -цепь

рецептора к интерлейкину-4 (IL-4R α), могут существенно влиять на риск развития аллергических реакций по типу гиперчувствительности немедленного типа на бета-лактамы антибиотики. Некоторые исследователи связывают полиморфизм генов IL-4 и IL-4R с развитием атопии и аллергических заболеваний [20]. Рецептор к интерлейкину-4 (IL-4R) имеет решающее значение для связывания и сигнализации интерлейкина-4 (IL-4), который вызывает пролиферацию В-клеток и способствует производству IgE [22]. Кроме того, IL-4 является активатором экспрессии высокоаффинного рецептора к IgE на В-клетках. Ещё одной функцией IL-4 является индукция производства молекул адгезии эндотелиальными клетками, что приводит к селективной аккумуляции эозинофилов в очаге воспаления [21]. IL-4 выступает

также как фактор роста T-лимфоцитов и тучных клеток и является ключевым сигналом дифференцировки T-клеток в CD4+ хелперы типа 2 [6]. IL-4R α locus кодирует альфа-цепь рецептора IL-4 и одновременно является функциональным геном-кандидатом, ответственным за развитие атопии и аллергических заболеваний [11].

Согласно результатам исследований, проведённых Ким и др. (Kim et al.), в качестве генетических факторов, отвечающих за развитие аллергической реакции немедленного типа на бета-лактамы антибиотики, могут являться полиморфизмы генов CD40 и CD40L [16].

Ген CD40 кодирует белок, который участвует в формировании иммунного ответа и воспалительного процесса, отвечает за развитие иммунологической памяти В-клеток и зависимое от T-клеток переключение

Таблица 2

Возможные генетические предикторы аллергических реакций при применении бета-лактамов антибиотиков [8]

Ген (полиморфизм)	Функция (что кодирует)	Популяция пациентов (зависит от того где пробыли исследования)	Частота встречаемости аллеля в популяции MAF (NCBI)	Результат исследования	Кто проводил исследования (ссылка)
CD40 (rs1883832)	Костимуляция выработки антител В-клетками	корейцы (азиаты)	0,25	Авторы отмечают наличие взаимосвязи между одновременным носительством этих двух полиморфизмов и развитием кожных аллергических реакций вызванных приёмом антибиотиков	16
CD40L (rs3092952)	Лиганд для CD40	корейцы (азиаты)	0,29		16
IL-4R α (rs1801275)	Кодирует альфа-цепь рецептора IL-4	китайцы (азиаты)	0,34	Авторы полагают, что данный аллель может быть ассоциирован с пенициллиновой аллергией	15
IL-4R α (rs1805010)	Кодирует альфа-цепь рецептора IL-4	китайцы (азиаты) французы (европейцы)	0,46	Данный аллель ассоциирован с крапивницей. Данный полиморфизм оказывает влияние на развитие атопии у женщин.	14
IL-4 промотор (rs2243250)	Промоторная область IL-4, регуляция экспрессии	Американцы европейского происхождения	0,49	Ассоциирован с астмой	10

Примечание: MAF (minor allele frequency) - частота встречаемости рецессивного аллеля.

классов иммуноглобулинов. Белок, кодируемый геном CD40L, экспрессируется на поверхности Т-клеток, он регулирует функцию В-клеток, связывая CD40 на их поверхности [9, 16]. Также CD40 и CD40L опосредованно индуцируют выработку интерлейкина-12 дендритными клетками, что, в свою очередь, приводит к усилению способности представлять антиген [9].

Однако, как показывают результаты поисковых исследований, роль отдельно взятого полиморфизма очень мала. Часто исследователи не находят статистически значимых различий при исследовании одного полиморфизма. Это не удивительно, т.к. в развитии аллергических реакций участвует огромное количество генов, и замена всего лишь одного нуклеотида в одном гене не может являться причиной серьезных нарушений в работе иммунной системы человека. Так, Обер и др. показали, что изучение гаплотипов в нескольких локусах IL-4R α гена может быть более информативным, чем отдельное исследование единичных нуклеотидных полиморфизмов [11].

Более значимые результаты получены в исследованиях, где изучалось взаимодействие двух и более полиморфизмов одновременно [10, 16].

Следует также отметить, что в зависимости от расовой принадлежности пациента один и тот же полиморфизм может выступать как индуктор аллергической реакции, так и выполнять протективную функцию (то есть чаще встречаться в контрольной группе). От расовой принадлежности пациента также зависит и то, будет ли в принципе проявляться действие полиморфизма или нет [10].

Для своих исследований мы выбрали наиболее значимые, с нашей точки зрения, полиморфизмы генов, которые уже изучались в исследованиях по типу слу-

чай-контроль на европейских и азиатских популяциях пациентов, и для которых обнаружено статистически значимое превышение частоты встречаемости у пациентов с реакциями гиперчувствительности по сравнению с контролем. Т.е. в наших исследованиях для предсказания возможных реакций гиперчувствительности мы будем изучать полиморфизмы генов, для которых ранее была обнаружена и подтверждена слабая ассоциация с аллергическими реакциями при применении бета-лактамов антибиотиков.

Такая стратегия предполагает выделение 4-5 самых «успешных» полиморфизмов и использование их в качестве генетических предикторов развития аллергических реакций при применении бета-лактамов антибиотиков (табл. 2).

Список литературы

1. **Драник Г.Н.** Клиническая иммунология и аллергология. М.: Астропринт. 1999. 603 с.
2. Клиническая иммунология и аллергология. Под ред. Лагора-младшего и др. Практика. 2000. 680 с.
3. **Новиков Д.К., Сергеев Ю.В., Новикова В.И.** Аллергические реакции на лекарства. Витебск. 1998. 203 с.
4. **Новиков П.Д.** Механизмы аллергии на лекарства-гаптены / П.Д., Д.К. Новиков // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. 2000. №4. С. 48-64.
5. **Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.** Иммунология. М.: Мир. 2000. 592 с.
6. **Симакина А.Р.** Исследование ассоциации полиморфизма гена α -цепи рецептора к интерлейкину-4 (IL4RA) с атопией и бронхиальной гиперреактивностью при бронхиальной астме. Материалы Всероссийской 66-й итоговой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова (Томск, 23–25 апре-

ля 2007 г.) / под ред. В. В. Новицкого, Л. М. Огородовой. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет. 2007. 359 с.

7. **Хабриев Р.У.** Антибактериальные лекарственные средства. Методы стандартизации препаратов. М: Медицина. 2004. 944 с.
8. **Чикало А.О., Сычев Д.А., Бердникова Н.Г., Кулес В.Г.** Поиск генетических предикторов реакций гиперчувствительности, вызванных применением бета-лактамов антибиотиков // Вестник Северо-западного государственного медицинского университета им. И.М. Мечникова. 2012. Т.4. №4. С. 93-97.
9. **Яруллин А.А.** Основы иммунологии. М.: Медицина. 1999. 608 с.
10. **Baye T.M.** Differences in candidate gene association between European ancestry and African American asthmatic children / T.M. Baye [et al.] // PLoS One. 2011. Feb. 28; 6 (2). e16522.
11. **Bottini N., Borgiani P., Otsu A., Saccucci P., Stefanini L., Greco E., Fontana L., Hopkin J.M., Mao X.Q., Shirakawa T.** IL-4 receptor alpha chain genetic polymorphism and total IgE levels in the English population: two-locus haplotypes are more informative than individual SNPs. Clin Genet. 2002 Apr; 61(4): 288-92.
12. **Classen D.C., Pestotnik S.L., Evans R.S., Lloyd J.F., Burke J.P.** Adverse drug events in hospitalized patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality // JAMA. 1997. 277. P. 301-306.
13. **Guéant J.L., Guéant-Rodriguez R.M., Gastin I.A., Cornejo-García J.A., Viola M., Barbaud A., Mertes P.M., Blanca M., Romano A.** Pharmacogenetic determinants of immediate and delayed reactions of drug hypersensitivity. Curr Pharm Des. 2008; 14(27): 2770-7.

14. Guglielmi L. IL-10 promoter and IL4-Ralpha gene SNPs are associated with immediate beta-lactam allergy in atopic women / L. Guglielmi [et al.] // Allergy. 2006. Aug; 61 (8). P. 921-927.

15. Huang C.Z. Polymorphisms and haplotype analysis of IL-4Ralpha Q576R and 175V in patients with penicillin allergy / C.Z. Huang, J. Yang, H.L. Qiao, L.J. Jia / Eur J Clin Pharmacol. 2009. Sep. 65 (9). P. 895-902.

16. Kim S.H. Adverse Drug Reaction Research Group in Korea. Allelic variants of CD40 and CD40L genes interact to promote antibiotic-induced cutaneous allergic reactions / S.H. Kim [et al.] // Clin Exp Allergy. 2009. Dec. 39 (12). P. 1852-1856.

17. Miller B., Hershberger E., Benziger D., Trinh M., Friedland I. Pharmacokinetics and safety of intravenous ceftolozane-tazobactam in healthy adult subjects following single and multiple ascending doses. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Jun; 56(6): 3086-91.

18. Pirmohamed M., Breckenridge A.M., Kitteringham N.R., Park B.K. Adverse drug reactions // BMJ. 1998. 316. P. 1295-1298.

19. Poon H., Chang M.H., Fung H.B. Ceftaroline fosamil: a cephalosporin with activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Ther. 2012 Apr; 34(4): 743-65.

20. Qiao H.L., Yang J., Zhang Y.W. Allergy. 2005 Aug; 60(8): 1053-9.

21. Rosenwasser L.J. Interleukin-4 and the genetics of atopy. N Engl J Med. 1997 Dec 11; 337(24): 1766-7.

22. Zhang W., Zhang X., Qiu D., Sandford A., Tan W.C. IL-4 receptor genetic polymorphisms and asthma in Asian populations. Respir Med. 2007 Jan; 101(1): 186-90.

Genetic predictors of a medicinal allergy on beta-lactam antibiotics

I.E. Groznova, D.A. Sychev, N.G. Berdnikova, A.O. Chikalo

In current clinical practice, there has been significant growth in the use of antibacterial drugs for the treatment of patients with a variety of infections. Beta-lactam antibiotics are among the most clinically important antibiotics used in medicine. Despite its high efficacy in the treatment of many infections, the scope of the beta-lactam antibiotics significantly limited adverse reactions that occur during treatment with these drugs. The most common of them in clinical practice is an allergic reaction. Beta-lactam antibiotics are drugs that are most often develop IgE-mediated allergic reactions. Now for the prediction of such side effects, numerous studies to find candidate genes involved in the development of allergic reactions to beta-lactam antibiotics. This article looks at the frequency of adverse reactions and structure of allergic genesis to beta-lactam antibiotics, the pathogenesis of allergic reactions, as well as strategies to find potential genetic predictors.

Key words: beta-lactam antibiotics, adverse drug reactions, genetic predictors.

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

РУБРИКАЦИЯ ЖУРНАЛА

1. Новые биомедицинские технологии
2. Работоспособность и выносливость в спортивной биомедицине
3. Новые регуляторные пептиды
4. Спортивное питание
5. Релевантное и альтернативное биомоделирование
6. Лабораторные животные
7. Методы биомедицинских исследований
8. Генетика
9. Доклинические исследования
10. Клинические исследования
11. Краткие сообщения
12. Практикум
13. Нормативные документы

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ

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

На первой странице следует указать: 1) предполагаемую рубрику журнала, 2) название статьи, 3) инициалы и фамилии авторов, контактная информация, 4) учреждения, в которых была проведена работа, город или населённый пункт. На той же странице печатается реферат (не более 250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов).

Таблицы и рисунки расставляются авторами по тексту. Рисунки в электронной форме прилагаются отдельными файлами.

В конце статьи приводится список цитированной литературы и ставятся собственноручные подписи всех авторов рукописи.

В конце статьи приводятся наименование статьи, фамилии авторов, реферат и ключевые слова на английском языке.

К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу и на отдельном листе – фамилию, имя, отчество автора, осуществ ляющего связь с редакцией, его почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты.

КОРРЕКТУРА

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

После опубликования статьи авторам высылается бесплатно 1 экземпляр журнала.

РУКОПИСИ НАПРАВЛЯТЬ ПО АДРЕСУ:

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

Электронный адрес НЦБМТ РАМН: matveyenkoel@mail.ru или scbmt@yandex.ru

Телефон редакции: 8-(495)-561-52-64.

Подробные требования к оформлению статей и электронную версию журнала можно посмотреть на сайте www.scbmt.ru.

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

Приглашаем Вас принять участие в ежегодной научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование», которая будет проводиться 21-22 мая 2013 г. в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России по адресу: 143442, Московская обл., Красногорский р-н, пос. Светлые горы, владение 1, тел. (495) 561-52-64, факс 561-52-73, e-mail: scbmt@yandex.ru

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ТЕМЫ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ПРОГРАММЫ КОНФЕРЕНЦИИ:

1. Лабораторные животные (новые технологии содержания, требования GLP, модели животных в биомедицинских исследованиях, биоэтические нормы и принципы в экспериментальной работе, новые методы оценки функциональных состояний лабораторных животных, лабораторные животные в современных фармакологических и токсикологических исследованиях, животные-модели и модели животных в сравнительных биологических исследованиях).

2. Альтернативное и биологическое моделирование в биомедицинских исследованиях (биологические и клеточные, математические, физико-химические модели, животные-модели).

3. Биомедицинская безопасность (безопасность нанобиотехнологических средств, клеточных технологий и иммунобиологических препаратов, лекарственная токсикология и безопасность фармацевтических средств).

Конференц-зал Центра и аудитории для работы секций имеют мультимедийное оборудование (компьютеры и проекторы) для презентаций к докладу. Время для доклада на пленарном заседании: 20 мин., на секциях — 10 мин. Возможно представление стендовых докладов.

Просьба к участникам выслать материалы докладов с указанием фамилии, имени, отчества (полностью), учреждения, названия доклада, необходимости мультимедийного оборудования для презентации, а также информации о необходимости бронирования места в гостинице. Присланные статьи в виде кратких сообщений будут опубликованы в журнале «Биомедицина». С правилами оформления статей можно ознакомиться на сайте www.scbmt.ru, в разделе журнал «Биомедицина» (Вниманию авторов).

Лабораторкорм

Более десяти лет коллектив нашей организации обеспечивает высококачественным **комбикормом для лабораторных животных**: научные медицинские и учебные учреждения России.

Реализуем:

- ✓ Оборудование для вивариев (клетки-стеллажи и др.);
- ✓ Подстилочный материал из древесной стружки;
- ✓ Зерно: пшеница, овес, ячмень;
- ✓ Премиксы.



**НАШИ КОРМА
полнорационные,
сбалансированные по
аминокислотному составу,
минералам и витаминам**

Доставка в любой регион России

Наш адрес: Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 9 (Виварий)
ООО «Лабораторкорм»

Телефоны: (495) 972-99-72, 972-16-87, 648-42-39;

Телефон/факс: (499) 612-99-09;

www.laboratorkorm.ru, e-mail: info@laboratorkorm.ru

на правах рекламы



БИОМЕДИЦИНА

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»

Филиал «Андреевка»

Филиал «Андреевка» (директор К.В.Афонин) образован на базе Центрального питомника лабораторных животных АМН СССР, который, в свою очередь, был создан в 1959 году. Филиал «Электрогорский» (директор С.Ф.Булатов) был образован на базе, созданного в 1974 г.

Постановлением Совета Министров СССР питомника. Основной задачей филиала является получение и выращивание лабораторных животных. Популяции животных для разведения в филиале постоянно обновляются за счет племенных ядер, передаваемых из лаборатории генетики Центра. Филиал обеспечивает своих потребителей конвенциональными

животными высокого качества, контролируруемыми по генетическим, физиологическим, морфологическим показателям состояния здоровья. Все животные сертифицированы в соответствии с Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев). С филиалами сотрудничает более 200 потребителей лабораторных животных из России и стран СНГ. Основными потребителями являются научно-исследовательские учреждения РАМН, РАН, Минздравсоцразвития, Министерства обороны РФ, учебные заведения медико-биологического профиля.

Филиал «Андреевка» предлагает следующих животных:

I. Морские свинки: альбиносы и пестрые

II. Генетически контролируемые колонии белых мышей (SHK, ICR) и крысы: мыши SHK-самки подвержены раку молочных желез (частота заболевания выше 50%)

III. Линейные мыши и крысы:

– мыши линии DBA – имеют светло-коричневую окраску шерсти, используются в онкологических, иммунологических, нейробиологических исследованиях, для изучения нарушений вестибулярного и слухового аппаратов;

– мыши линии BALB/C – белой окраски, альбиносы, используются во всех медико-биологических исследованиях. Высокая частота опухолей легких, яичников и надпочечников, лимфосарком;

– мыши линии C57BL/6 – черной окраски. Используются в изучении скелетных аномалий, дефектов развития головы и глаз. Стандартная

линия для поддержания мутаций. Чувствительны к действию канцерогенов, стафилококков, сальмонелл.

– мыши линии CBA – серой окраски, используются в радиологии, медико-биологических геронтологических исследованиях, для изучения спонтанных опухолей печени.

– крысы линии Wistar – белой окраски, альбиносы. Используются для онкологических исследований, для изучения поведенческих реакций.

IV. Межлинейные гибриды мышей:

– F1 CBA x C57BL/6 – шерсть серого окраса;

– F1 C57BL/6 x DBA – шерсть черного окраса. Гибриды F1 используются для онкологических и радиационных исследований.



141551. М.О., Солнечногорского район, п/о Андреевка, д. 49

Тел. 8(495)536-09-18; 8(495)536-37-58 Факс: 8(495)536-28-33

E-mail: andreevka-kv@rambler.ru

