

Научный журнал.

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

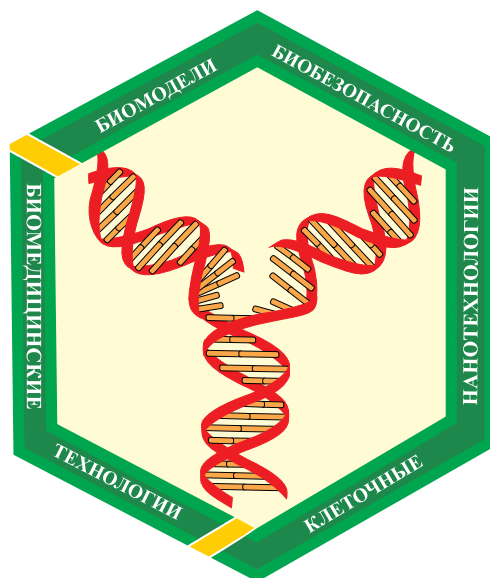
Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати

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. Матвеевко (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 00.06.2013 г.

Тираж 3 000 экз.

Содержание

НОВЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ

Н.Н. Каркищенко, Д.Б. Чайванов, А.А. Вартанов Расчет потенциалов и токов стимуляции для двухмерной модели скальпа с учетом коэффициентов затекания в мозг.....	6
Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, С.Л. Люблинский, Г.Д. Капанадзе, А.О. Ревякин, Л.А. Болотских, Н.В. Касинская, Н.В. Станкова Роль микроэлементов в спортивном питании и безопасность металлохелатов.....	12

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

П.А. Ворончихин, М.А. Сырцова, С.В. Талантов, И.Л. Ерохина, Д.Э. Коржевский, Е.Г. Сухорукова, С.В. Оковитый, А.В. Куликов Влияние метопролола и бисопролола на течение экспериментальной бронхиальной астмы.....	48
Н.Ю. Корягина, Г.И. Пронина, А.О. Ревякин, О.И. Степанова, О.В. Баранова, Г.Д. Капанадзе, И.Ю. Меньшиков Искусственно вызванная патология гепатопанкреаса речных раков.....	58
Е.Н. Лазарева, Х.М. Галимзянов, М.А. Самотруева Влияние мелаксена на функциональную активность тромбоцитов в условиях экспериментальной гипо- и гиперагрегации.....	61
Ю.С. Медведева, Е.Н. Архипова, И.Б. Алчинова, М.А. Озерова, А.С. Бобе, Ц.Ц. Содбоев, А.А. Антипов, М.Ю. Карганов Особенности организменного ответа мышцей разных линий на острое гамма-облучение.....	67
Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина, А.О. Ревякин, Г.Д. Капанадзе, О.И. Степанова, О.В. Баранова, Ю.Б. Львов Моделирование патологии поджелудочной железы у рыб.....	80
Э.Р. Шайхутдинова, О.Н. Хохлова, Г.А. Слащева, А.Н. Мурашев Защитные эффекты фармакологического preconditionирования морфином на модели острого инфаркта миокарда у крыс CD.....	82
М.Ю. Ярец, Д.Б. Чайванов Особенности авторегуляторных способностей управления альфа-ритмом художников и артистов, выявленные в биоуправляемом тренинге по стимулам визуальной и звуковой модальности.....	89
А.Л. Ясенявская, М.А. Самотруева, С.А. Лужнова Психотропные эффекты эноксипина в условиях иммобилизационного стресса.....	95

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

А.Г. Берзина, Н.Б. Гамалея, Г.Д. Капанадзе

Методические подходы к получению антивидовых антисывороток с целью их использования в иммунофармакологических исследованиях..... 101

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Б.И. Кантемирова, Д.А. Сычев, В.Н. Каркищенко

Исследование глутатиона как маркера второй фазы биотрансформации ксенобиотиков у детей с различной соматической патологией на фоне проводимого лечения 109

ПРАКТИКУМ

Н.Н. Булгакова, В.В. Смирнов, В.И. Фабелинский, А.Г.Федотов, Н.И. Казачкина, Г.Д. Капанадзе

Лазерный спектрально-флуоресцентный кольпоскоп: доклиническая апробация на экспериментальной опухолевой модели 114



Content

NEW REGULATORY PEPTIDES

N.N. Karkischenko, D.B. Chayvanov, A.A.Vartanov The calculation of potential and current stimulation for the two-dimensional model of the scalp to the coefficients flowing into the brain.....	6
N.N. Karkishchenko, V.N. Karkishchenko, S.L. Lublin, G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin, L.A. Bolotskikh, N.V. Kasinsky, N.V. Stankova Role of microcells in a sports food and safety of metalchelates.....	12

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

P.A. Voronchikhin, M.A. Syrtcova, S.V.Talantov, I.L. Erokhina, D.E. Korzhevskiy, E.G. Sukhorukova, S.V. Okovitiy, A.V. Kulikov Effect of metoprolol and bisoprolol on the course of experimental bronchial asthma.....	48
N.Yu. Koryagina, G.I. Pronina, A.O. Revyakin, O.I. Stepanova, O.V. Baranova, G.D. Kapanadze, I.Yu. Menshikov Artificially caused hepatopankreas's pathology of river crayfish.....	58
E.N. Lazareva, Kh.M. Galimzyaynov, M.A. Samotrueva The influence of melaxen on the function of thrombocytes in the experimental hypo- and hyperaggregation.....	61
Yu.S. Medvedeva, E.N. Arkhipova, I.B. Alchinova, M.A. Ozerova, A.S. Bobe, C.C. Sodboev, A.A. Antipov, M.Yu. Karganov Features organismal response of mice of different lines to acute gamma-irradiation	67
G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze, O.I. Stepanova, O.V. Baranova, Yu.B. Lvov Modelling of pancreas pathology in fish	80
E.R. Shaykhutdinova, O.N. Khokhlova, G.A. Slashcheva, A.N. Murashev Protective effect of pharmacological preconditioning by morphine on acute myocardial infarction in CD rats	82
M.Yu. Yarets, D.B. Chayvanov Features autoregulatory abilities of alpha rhythm management of an artists and the actors, revealed in biocontrolled training on incentives of a visual and sound modality.....	89
A.L. Yasenyavskaya, M.A. Samotrueva, S.A. Luzhnova Psychotropic effects of emoxipine in the conditions of the immobilization stress.....	95

BIOMEDICAL METHODS

A.G. Berzina, N.B. Gamaleya, G.D. Kapanadze

Methodical approaches to production of antispecies antisera for immunopharmacological studies..... 101

CLINICAL RESEARCHES

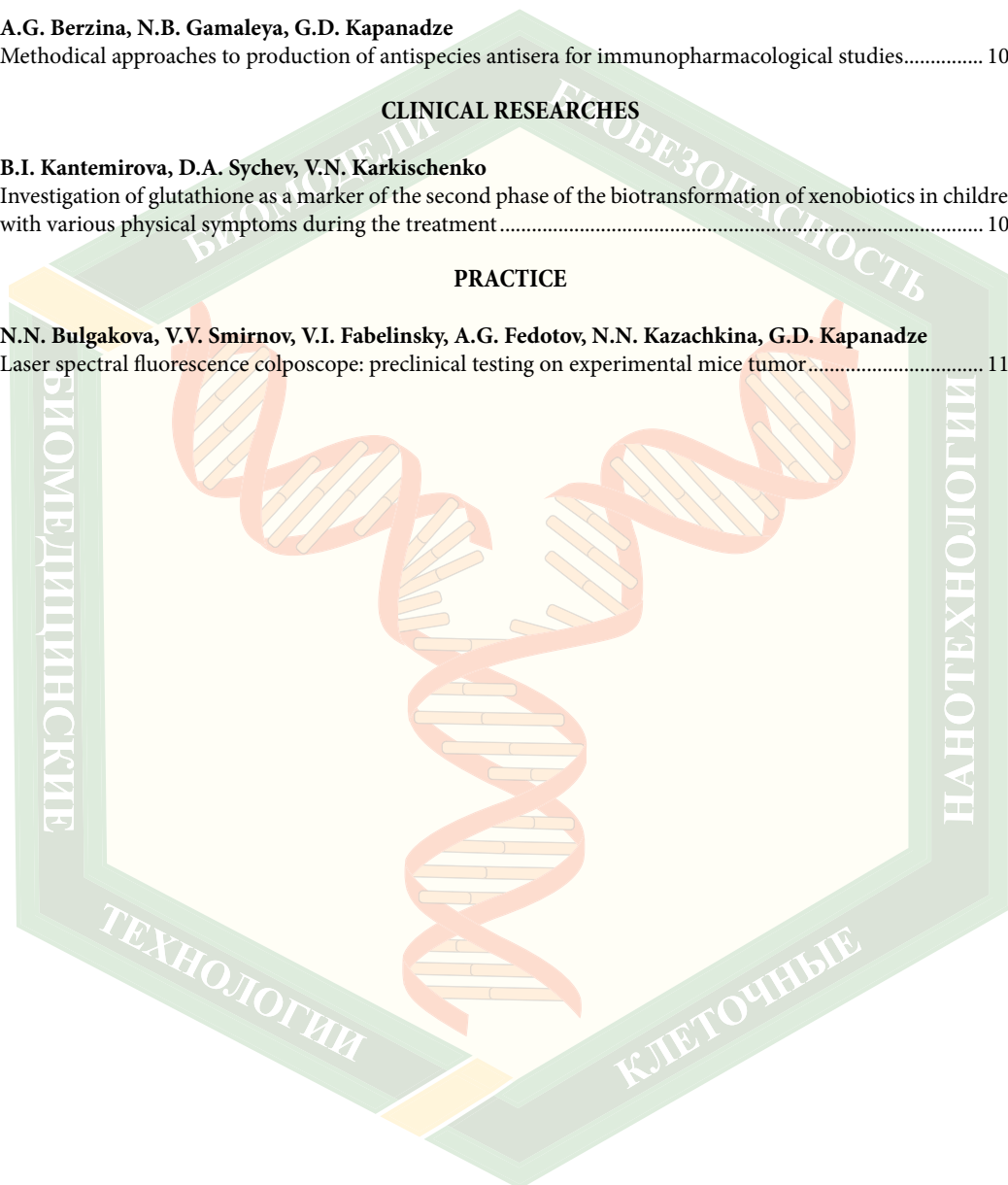
B.I. Kantemirova, D.A. Sychev, V.N. Karkischenko

Investigation of glutathione as a marker of the second phase of the biotransformation of xenobiotics in children with various physical symptoms during the treatment..... 109

PRACTICE

N.N. Bulgakova, V.V. Smirnov, V.I. Fabelinsky, A.G. Fedotov, N.N. Kazachkina, G.D. Kapanadze

Laser spectral fluorescence colposcope: preclinical testing on experimental mice tumor..... 114





Расчет потенциалов и токов стимуляции для двухмерной модели скальпа с учетом коэффициентов затекания в мозг

Н.Н. Каркищенко¹, Д.Б. Чайванов^{1,2}, А.А. Вартанов^{1,2}

¹ — ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² — Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

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

В статье рассмотрены проблемы построения математических моделей распределения токов при транскраниальной микрополяризации, приведена оценка коэффициента затекания тока в ткани мозга. Было описано построение модели в общем случае и сопутствующие сложности, приведена упрощенная модель и рассмотрены различные аспекты ее применения.

Ключевые слова: нейростимуляция, микрополяризация, математическое моделирование.

Как известно, транскраниальная микрополяризация имеет большое значение для лечения различных заболеваний, таких как детский церебральный паралич, задержки психического развития, болезнь Паркинсона, нарушения речи, головные боли [1]. Микрополяризацию применяют также для лечения таких заболеваний как шизофрения с синдромом вербального псевдогаллюциноза, депрессия и др. заболеваний ЦНС [5-9]. Кроме того, известно, что постоянный ток является фактором, стимулирующим рост клеточных структур, особенно это выражено в случае органических повреждений мозга [5, 9]. Для решения прикладных задач создания и совершенствования

методик в этой области важна разработка математических моделей растекания токов по скальпу, черепу, структурам коры больших полушарий головного мозга человека. Примерная оценка токов в зависимости от размера электродов была нами проделана в работе [8].

Система уравнений, описывающая распространение постоянного и низкочастотного тока в скальпе черепа и головном мозге человека, состоит из двух уравнений. Первое векторное уравнение отражает закон Ома для непрерывной среды в приближении пренебрежимо малого реактивного сопротивления, второе — закон сохранения заряда в среде с пренебрежимо малой удельной емкостью.

$$\begin{cases} j = \lambda \cdot grad(\varphi) \\ div(j) = 0 \end{cases} \quad (1)$$

где:

j — плотность тока,

λ — проводимость,

φ — потенциал.

Система уравнений (1) может быть существенно упрощена. Для этого возьмем дивергенцию от левой и правой части первого уравнения системы и, приравнявая дивергенцию плотности тока к нулю согласно второму уравнению системы, получим:

$$div j = div(\lambda grad j) = 0 \quad (2)$$

Такое преобразование позволит нам переписать уравнение (2) в виде:

$$\begin{cases} div(\lambda \cdot grad(\varphi)) = 0 \\ j = \lambda \cdot grad(\varphi) \end{cases} \quad (3)$$

Таким образом, система из 4-х скалярных уравнений (1) свелась к решению одного скалярного уравнения для потенциала и последующего нахождения поля плотности тока посредством простого дифференцирования.

Нужно отметить, что вычисления в описанной трехмерной модели довольно сложны, и ошибка, заключенная в данных о размерах и свойствах среды, оказывает существенное влияние на результат. При использовании опосредованной локализации ошибку привносит большая вариабельность структур мозга у различных субъектов, при непосредственной — низкая точность при распознании МРТ-изображения. Поэтому нами далее рассмотрена упрощенная модель растекания тока при микрополяризации.

Упрощенная модель строится следующим образом. Согласно известным данным, для проводимости тканей головы верно, что проводимость скальпа много больше проводимости черепа, и растекание тока, в основном, происходит по скальпу. Поэтому имеет смысл рассмотреть модель растекания постоянного электрического тока по плоской поверхности от электрода, расположенного на данной поверхности. В качестве электрической модели головы используем 6-слойную модель, промежуточную по точности между 3- и 8-слойной моделями, приводимыми В.В. Гнездицким [3]. Проводимости и размеры основных тканей головы в такой модели приведены в таблице.

Таблица

Проводимости и размеры основных тканей головы

Название ткани	Проводимость (Ом*м)-1	Размеры, мм
Скальп	0,330	5
Верхняя костная пластина	0,004	1,5
Ячеистый слой кости	0,050	4
Нижняя костная пластина	0,004	1,5
Твердая мозговая оболочка	0,01	2
Мозг	0,270	76

В таком случае система уравнений (1) ограничивается на плоскость, но во втором уравнении появляется дополнительный коэффициент, характеризующий затекание тока внутрь черепа через скальп. Система уравнений принимает вид:

$$\begin{cases} j = \lambda \cdot grad(\varphi) \\ div(j) = q \end{cases} \quad (4)$$

Методы решения этой системы с помощью численных методов существенно проще, чем для системы (1) из-за меньшей размерности и отсутствия разрывных коэффициентов, возникающих в системе (1) из-за непостоянности сопротивления тканей головы человека. Система (4) преобразуется аналогично системе (1) к виду:

$$\begin{cases} div(\lambda \cdot grad(\varphi)) = q \\ j = \lambda \cdot grad(\varphi) \end{cases} \quad (5)$$

При этом верно, что $q = Ku$, где K — коэффициент затекания тока.

Для расчета коэффициента затекания тока воспользуемся данными табл. Сопротивление каждого слоя черепа площадью S может быть рассчитано по формуле:

$$R_i = \frac{d_i}{\rho_i \cdot S},$$

где:

d_i — диаметр i того слоя,

R_i — сопротивление i того слоя,

ρ_i — проводимость i того слоя,

S — площадь слоя.

Тогда для трехслойной модели черепа получаем:

$$R_{\text{черепа}} = \frac{1}{\frac{1}{R_2} + \frac{1}{R_3} + \frac{1}{R_4} + \frac{1}{R_5}} \equiv \frac{S}{\left(\frac{\rho_{\text{вкп}}}{d_{\text{вкп}}} + \frac{\rho_{\text{яск}}}{d_{\text{яск}}} + \frac{\rho_{\text{нкп}}}{d_{\text{нкп}}} + \frac{\rho_{\text{тмо}}}{d_{\text{тмо}}} \right)},$$

где индексами *вкп*, *яск*, *нкп*, *тмо* обозначаются соответственно верхняя костная пластина, ячеистый слой кости, нижняя костная пластина и твердая мозговая оболочка. Здесь мы приближенно полагаем, что толщина черепа существенно меньше диаметра головы и, следовательно, площадь всех слоев черепа можно считать одинаковой.

Теперь для плотности тока, затекающего в мозг, получим:

$$q = \frac{I}{S} = \frac{R \cdot u}{S} \equiv \frac{u}{\left(\frac{\rho_{\text{вкп}}}{d_{\text{вкп}}} + \frac{\rho_{\text{яск}}}{d_{\text{яск}}} + \frac{\rho_{\text{нкп}}}{d_{\text{нкп}}} + \frac{\rho_{\text{тмо}}}{d_{\text{тмо}}} \right)},$$

Если в силу больших геометрических размеров и высокой проводимости мозга принять его потенциал равным нулю во всем объеме и, соответственно, положить $u = \phi$, то для коэффициента K будет верно выражение:

$$K = \frac{q}{\varphi} = \frac{1}{\left(\frac{\rho_{\text{вкп}}}{d_{\text{вкп}}} + \frac{\rho_{\text{яск}}}{d_{\text{яск}}} + \frac{\rho_{\text{нкп}}}{d_{\text{нкп}}} + \frac{\rho_{\text{тмо}}}{d_{\text{тмо}}} \right)}.$$

Для достижения наибольшей точности толщины слоев можно получить по данным КТ и/или МРТ. Менее точным могут являться средние данные по популяции с учетом места наложения электрода, и, наконец, проще всего взять усредненные данные из табл. В послед-

нем случае, приводимом нами для примера, получим $K=0,04$.

Нужно задать граничные условия для данной системы. Т.к. при микрополяризации, в основном, используются электроды прямоугольной и эллиптической формы, мы ограничимся рассмотрением именно таких электродов. Ограничим область определения кругом большого радиуса, на границе которого будем считать потенциал нулевым. В центре круга разместим электрод эллиптической или прямоугольной формы, внутри которого положим потенциал равным единице и выполним расчет с такими граничными условиями. Для случая стимуляции током заданной величины необходимый потенциал находится по формуле:

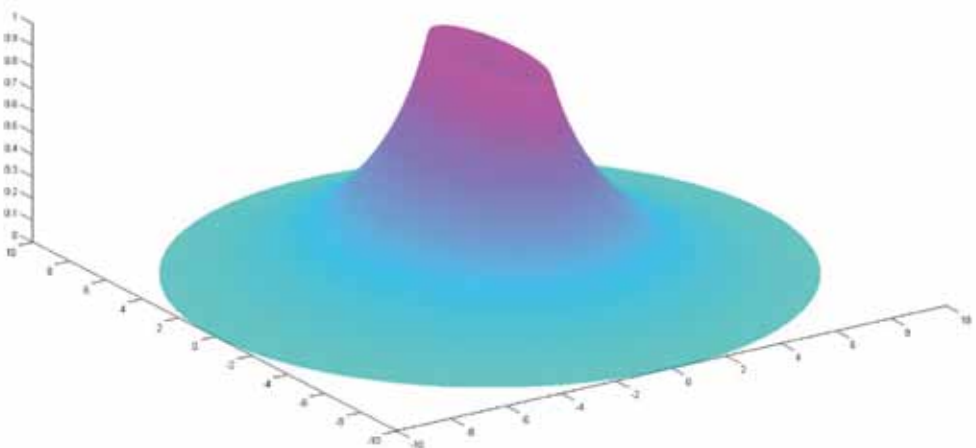
$$U_{реал} = \frac{I}{\sum I_u},$$

где $\sum I_u$ — сумма токов, втекающих

в мозг и растекающихся по скальпу, находящаяся из вычисленного распределения.

Нами была написана компьютерная программа, производящая вычисления в данной модели, в среде MATLAB. Данная система решается с помощью методов MATLAB PDE Toolbox с использованием построения разностной схемы с последующим решением возникающей линейной системы методом конечных элементов.

A



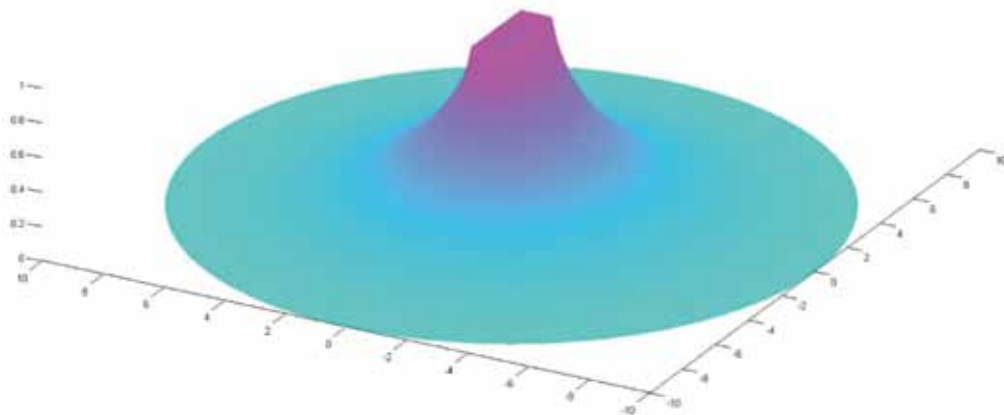
Б

Рис. График рассчитанного потенциала в упрощенной модели. **А** — потенциал при $K = 0,04$, эллиптическая форма электрода; **Б** — потенциал при $K=0,04$, прямоугольная форма электрода.

Сетка для разностной аппроксимации была выбрана необходимым образом с учетом характерных размеров электрода (0,5 см) и головы человека [2, 4]. Программа имеет два основных варьируемых входных численных параметра: сопротивление плоской среды модели и коэффициент затекания K . Полученные данные расчета потенциала при значениях параметров $K=0,04$; $r=1$; $r=0,5$ приведены на рисунке.

Как видно из проведенных нами численных экспериментов, характер распределения потенциала несущественно зависит от геометрической формы электрода и во всех случаях имеет свойство затухать на достаточно большом расстоянии от электрода.

Полученные расчеты позволяют сделать вывод о корректности ограничения области определения кругом достаточно большого радиуса, сделанного в рамках модели, и оценить размер круга неравенством:

$$R \geq 5d,$$

где R — радиус круга, d — диаметр электрода.

Неравенство верно для представляющих интерес значений параметров размера и формы электрода, сопротивления и коэффициента затекания. Напомним, что диаметром произвольной фигуры называется максимальная длина прямолинейного отрезка, соединяющего точки фигуры.

Представленный расчет позволяет получить примерные данные о характере растекания тока при транскраниальной микрополяризации с использованием электродов стандартной формы и сориентироваться в дальнейших исследованиях в этом направлении, с целью оптимизации существующих и разработки новых инновационных методик нейростимуляции.

Список литературы

1. *Бехтерева Н.П., Аничков А.Д., Гурчин Ф.А., Дамбинова С.А., Илюхина В.А. и др.* Лечебная электрическая стимуляция мозга и нервов человека / под ред. Н.П.Бехтеревой. — М.: АСТ; СПб.: Сова; Владимир: ВКТ. 2008. 464 с.
2. *Вартанов А.А., Чайванов Д.Б., Вартанов А.В.* Локализация на скальпе проекций поверхностных структур мозга по атласу Тайлераха. НИЦ «Курчатовский институт». — М., 2011.
3. *Гнездицкий В.В.* Обратная задача ЭЭГ и клиническая электроэнцефалография. — М., «МЕДпресс-информ». 2004. 624 с.
4. *Каркищенко Н.Н., Вартанов А.А., Вартанов А.В., Чайванов Д.Б.* Локализация проекций полей Бродмана коры головного мозга человека на поверхность скальпа / Биомедицина. 2011. № 3. С. 40-45.
5. *Пинчук Д.Ю.* Транскраниальные микрополяризации головного мозга: клиника, физиология. — С.-Пб.: «Человек». 2007. 496 с.
6. *Пономаренко Г.Н.* Физические методы лечения. — С.-Пб. 2002.
7. *Раева С.Н.* Микроэлектродные исследования активности головного мозга человека. — М. 1977.
8. *Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.* Математическая модель биофизических процессов при транскраниальной микрополяризации / Биомедицина. 2011. № 3. С. 6-11.
9. *Шелякин А.М., Пономаренко Г.Н.* Микрополяризация мозга. — С.-Пб. 2006.

The calculation of potential and current stimulation for the two-dimensional model of the scalp to the coefficients flowing into the brain

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

The paper considers the problem of constructing mathematical models of current distribution in transcranial, give an estimate of the coefficient of current flowing in the brain tissue. It has been described construction of the model, in general, and related difficulties, a simplified model, and discussed various aspects of its application.

Key words: neurostimulation, transcranial direct current stimulation, mathematical modeling.

Роль микроэлементов в спортивном питании и безопасность металлохелатов

Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, С.Л. Люблинский, Г.Д. Капанадзе, А.О. Ревякин, Л.А. Болотских, Н.В. Касинская, Н.В. Станкова

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

Контактная информация: д.м.н., проф. Каркищенко Владислав Николаевич, scbmt@yandex.ru

В остром эксперименте была исследована токсичность хелатных соединений цинка, магния, марганца, железа, кобальта, йода, а также их смеси в различных дозах. Данные соединения могут быть использованы в качестве составных компонентов для продукта спортивного питания «МиоАктив-Спорт». Показан токсический эффект как отдельных хелатных соединений, так и их смеси в эксперименте на лабораторных аутбредных мышцах в дозах, многократно превышающих терапевтическую. Установлено, что при 100-500-кратном превышении терапевтической дозы некоторые хелатные соединения проявляют токсический эффект, при этом четко наблюдается конкуренция жизненно важных микроэлементов при всасывании в желудочно-кишечном тракте.

Ключевые слова: МиоАктив-Спорт, хелаты, мышцы, острая токсичность.

Разработка биологически активных препаратов из натурального сырья является актуальной в первую очередь благодаря тому, что, в отличие от целого ряда синтетических и гормональных лекарственных препаратов, они не оказывают влияния на организм на генетическом уровне, не вызывают активных аллергических реакций, их применение не приводит к накоплению в организме большого количества вредных чужеродных соединений.

«МиоАктив-Спорт» — это специально разработанный комплексный высокобелковый полностью растворимый продукт, предназначенный для профессиональных спортсменов и олимпийского резерва, а также для спецконтингента, подверженного повышенным физическим и психоэмоциональным нагрузкам. Он представляет собой концентрированный комплекс основных жизненно

необходимых пищевых и биологически активных веществ, улучшающих способность человека переносить физические и психоэмоциональные нагрузки. В результате научных исследований и испытаний разработчики «МиоАктив-Спорт» полностью отказались от использования химически синтезируемых аминокислот и витаминов, создав продукт, основные компоненты которого имеют натуральное природное происхождение. Белковые, полипептидные и аминокислотные компоненты имеют животное происхождение и получают путем ферментации и гидролиза белков сыворотки молока, мяса крупного рогатого скота и птицы. За счет современных технологий производства аминокислотный, витаминный, макро- и микроэлементный состав «МиоАктив-Спорт» оптимизирован с учетом метаболизма человека, подверженного высоким физическим

нагрузкам. Рациональное распределение компонентов «МиоАктив-Спорт» обеспечивается за счет современных методов аналитического контроля готового сырья [7, 10, 11].

Дальнейшие перспективы разработки новых рецептур «МиоАктива» связаны с металлохелатными и другими компонентами. Данные по безопасности этих соединений весьма скудны и противоречивы, поэтому оценка безопасности хелатных компонентов явилась целью наших исследований.

Роль органических форм микроэлементов в профилактике их дефицита у человека

Среди пищевых факторов, имеющих особое значение для поддержания здоровья, работоспособности и активного долголетия человека, важнейшая роль принадлежит минеральным веществам. Они абсолютно необходимы для обеспечения всех жизненных функций, включая воспроизводство.

Широкое распространение в настоящее время дефицита жизненно необходимых элементов — чрезвычайно серьезная проблема не только для развивающихся, но и для экономически развитых государств. Так, по статистике ВОЗ, в мире насчитывается более 2 млрд человек, страдающих от дефицита железа, около 1,5 млрд — от дефицита йода, а от дефицита кальция — около половины населения. Дефицит макро- и микронутриентов в организме людей является причиной роста случаев многих заболеваний, которые 30-40 лет назад встречались гораздо реже — гипертонической болезни, анемии, атеросклероза, диабета, болезней опорно-двигательного аппарата, желудочно-кишечных и эндокринных

заболеваний, болезней обмена веществ и др. [18, 20].

Фундаментальные исследования основателя современного учения о биосфере академика В.И. Вернадского (1940 г.) внесли существенный вклад в понимание значения минеральных веществ для существования живых организмов.

В.И. Вернадский ввел представление о биогенной миграции атомов (переходе элементов из организма в организм) и их распространении по планете в результате действия биогеоценотических связей, объединяющих живой и неживой мир. Согласно его учению, живое вещество, трансформируя солнечное излучение, вовлекает химические элементы биосферы Земли в непрерывный круговорот.

В табл. 1 приведен приблизительный химический состав человеческого организма с массой тела 70 кг, содержащего 43,6 кг воды, 11,3 кг белков, 10,7 кг жиров, 0,4 кг углеводов и 4 кг золы.

Наряду с конституционными (кислород, углерод, водород, азот) и макроэлементами, содержащимися в концентрации 0,01-1% на сырое вещество (кальций, фосфор, калий, сера, кремний, натрий и магний), которые составляют более 99% всех атомов организма, в нем присутствуют микроэлементы в суммарной концентрации менее 0,01% от общей массы тела

Таблица 1
Химический состав тела человека

Структурный элемент	Вес/кг
Кислород	46,0
Углерод	13,0
Водород	7,0
Азот	1,8
Кальций	1,2

Структурный элемент	Вес/кг
Фосфор	700,0
Сера	175,0
Калий	140,0
Хлор	105,0
Натрий	90,0
Магний	35,0
Железо	4,0
Цинк	2,0
Рубидий	1,0
Структурный элемент	Вес/мг
Стронций	140,0
Медь	100,0
Алюминий	100,0
Свинец	80,0
Олово	30,0
Йод	30,0
Кадмий	30,0
Марганец	20,0
Ванадий	20,0
Барий	16,0
Мышьяк	100,0
Ртуть	50,0
Никель	10,0
Селен	10,0
Хром	6,0
Молибден	5,0
Кобальт	3,0

(железо, цинк, медь, марганец, хром, кобальт, селен, йод, фтор и т.д.).

Микроэлементы условно делят на две группы: абсолютно, или жизненно необходимые (в табл. выделены жирным шрифтом) и т.н. «вероятно необходимые».

Микроэлементы являются жизненно необходимыми (эссенциальными), если

при их отсутствии или недостатке нарушается нормальная жизнедеятельность организма.

Творчески развивая идеи В.И. Вернадского о роли элементного состава почвы в эволюции организмов, академик А.П. Виноградов (1949 г.) создал учение о биогеохимических провинциях, богатых или бедных йодом, кобальтом, медью, фтором, селеном и другими элементами. Разработанное им учение о микроэлементах имеет исключительную актуальность для медицинской науки и сейчас [8].

В настоящее время к микроэлементам относят патологические процессы, обусловленные дефицитом, избытком или дисбалансом микроэлементов в организме. Среди них можно выделить гипо- и гипермикроэлементозы экзогенного и эндогенного происхождения. Наибольшую распространенность имеют экзогенные эндемические гипомикроэлементозы, которые связаны не только с аномальным содержанием микроэлементов в окружающей среде, но и с недостаточным поступлением их и пищей. В последнее время наблюдается рост вторичных микроэлементазов, возникающих при различных заболеваниях, а также наследственных и врожденных гипомикроэлементозов. Вследствие резко возросшего загрязнения окружающей среды наблюдается значительное увеличение ареалов техногенных гипермикроэлементозов в индустриально развитых регионах и мегаполисах, вокруг промышленных комплексов и в местах техногенных катастроф.

В отдельную группу можно выделить ятрогенные микроэлементазы, связанные с приемом лекарств. Они развиваются в результате интенсивного перорального и ингаляционного лечения содержащи-

ми микроэлементы препаратами поддерживающей терапии (энтерального и парентерального питания) или некоторых лечебных процедур (например, диализа) [19, 25].

На протяжении последних ста лет мировой и отечественной наукой были проведены многочисленные клинико-нутрициологические исследования и приложены значительные усилия по ликвидации наиболее распространенных алиментарнозависимых состояний.

В настоящее время существуют три основных подхода [4] к решению проблемы дефицита макро- и микроэлементов, а также профилактике болезней, вызванных их недостатком в рационе питания:

первый — дополнительное потребление продуктов с заведомо высоким содержанием минеральных веществ;

второй — применение лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище на основе различных соединений макро- и микроэлементов;

третий — целенаправленное обогащение дефицитными элементами продуктов питания массового потребления.

Необходимо отметить, что за последние 50 лет современные интенсивные приемы ведения растениеводства и животноводства привели к значительному (в разы) уменьшению содержания минеральных веществ в муке, овощах, фруктах, мясе, молоке и т.д. Значительное уменьшение содержания биогенных элементов происходит после кулинарной обработки при промышленном производстве пищевых продуктов. Кроме того, практический опыт показывает, что потребление продуктов с высоким природным содержанием макро- и микроэлементов, с одной стороны, делает питание людей довольно дорогостоящим, а, с другой стороны, не влияет заметным об-

разом на решение проблемы дефицитных состояний. Подобная сбалансированная диета может быть эффективной только для сохранения здоровья после нормализации баланса макро- и микронутриентов в организме.

Применение второго подхода существенно ограничивается высокой стоимостью имеющихся на рынке препаратов, существующей вероятностью передозировки и наличием у большинства из них выраженных побочных эффектов. Так, например, при потреблении препаратов на основе неорганических солей железа в мире зафиксировано более 110 тыс. случаев отравлений у детей, некоторые — с летальным исходом [2]. Небезопасным является также использование препаратов на основе соединений неорганического йода, кальция, меди, цинка и др.

В настоящее время считается, что наиболее оптимальным для профилактики алиментарнозависимых дефицитных состояний человека является обогащение необходимыми макро- и микронутриентами продуктов массового питания.

Многие развитые страны (США, Англия, Швеция, Голландия) приняли общенациональные программы по обогащению продуктов питания макро- и микронутриентами. Тем не менее, опыт этих стран показывает, что использование для данных целей неорганических соединений элементов не обеспечивает необходимый уровень их усвоения. Кроме того, наблюдаются их значительные потери в процессе производства, изменения в худшую сторону органолептических свойств таких продуктов питания, а также наличие серьезных побочных эффектов: гемосидероза (при использовании неорганических соединений железа), тиреотоксикоза (при обогащении неорганическим йодом) и т.д.

Не случайно во многих странах обогащение продуктов питания неорганическими соединениями в настоящее время запрещено. Статистические данные о распространенности в мире, например, железо-, йод- и кальцийдефицитных состояний также свидетельствуют о неэффективности данного подхода [15].

Убедительным примером является обещание ВОЗ ликвидировать дефицит йода во всем мире к 2000 г., которое было не выполнено. В 2002 г. на специальной сессии Генеральной Ассамблеи ООН по вопросам материнства и детства, посвященной проблеме йоддефицитных заболеваний, было решено принять максимум усилий для ликвидации йоддефицита до 2005 г., что вновь не было выполнено. Это является важнейшим доказательством неэффективности используемого подхода Дефицит йода продолжает оставаться серьезной проблемой, остро стоящей перед правительствами 153 стран мира, которую необходимо решить в ближайшее время.

Таким образом, существующие медико-биологические проблемы, связанные с дефицитом макро- и микроэлементов в организме, являются одними из серьезнейших в биохимии и физиологии питания современного человека, и ни в одной из стран мира до сих пор не решены.

В связи с этим, сегодня особенно необходима разработка принципиально новых высокоэффективных и безопасных подходов к решению столь сложнейшей проблемы. По нашему мнению, для полной ликвидации микроэлементозов различной этиологии наиболее перспективным является применение природных биогенных форм макро- и микроэлементов, а также их полных синтетических аналогов.

Биологическая эффективность использования микроэлементов в организме определяется уровнем сбалансированности рационов в отношении питательных и биологически активных веществ; степенью усвоения и депонирования микроэлементов, взаимодействием их между собой и другими пищевыми веществами в процессе всасывания, транспорта и экскреции; состоянием регуляторных систем, возрастом, полом и физиологическим состоянием организма. В связи с этим, необходимо использовать такие формы микроэлементов, которые будут наиболее физиологически адекватны потребностям организма человека и животных, каковыми и являются органические формы элементов.

Многочисленными исследованиями установлено, что в обмене всех без исключения минеральных веществ участвуют различные органические соединения — белки, пептиды, аминокислоты, фосфолипиды, углеводы, карбоновые кислоты, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды и другие лиганды, которые через координационные связи с минеральными веществами образуют комплексоны.

Комплексоны, или биокоординационные соединения, составляют обширный и разнообразный класс веществ, к которым относятся также многие металлоорганические соединения, играющие большую роль в физиологических и биохимических процессах.

Особый интерес для профилактики микроэлементозов представляют хелатные соединения биогенных элементов с органическими лигандами. В живой природе существуют многочисленные хелатные соединения микроэлементов с лигандами органического происхождения — гемоглобин, миоглобин, хлорофилл, витамин В12 и многие другие.

Роль и место хелатных соединений в организме человека и животных

Понятие «хелат» происходит от греч. «chelle» (коготь, клешня краба) и было введено в 1920 г. Морганом и Дрю. В хелатных соединениях лиганд центральный атом элемента охватывается (блокируется), будто клешней, двумя или несколькими зубцами (своими донорными атомами). Поэтому хелатные соединения элементов отличаются особой прочностью.

Хелат — это наиболее энергетически выгодная для организма форма взаимодействия металла с лигандом. Активность элемента в этих комплексах часто возрастает с сотни и тысячи раз в сравнении с активностью металла в ионном состоянии. Примером этому служит тот факт, что более чем у двухсот ферментов (а это 25% из всех известных) активность определяется наличием в их активном центре атомов различных металлов. В настоящее время общепризнано, что биологическая активность микробиогенных элементов и их широкое участие во всех важнейших метаболических реакциях и клеточном химизме зависит от их хелатирующих свойств.

В основе эффективности и безопасности применения хелатных соединений для профилактики микроэлементозов лежат естественные физиолого-биохимические механизмы усвоения минералов, присутствующие в организме. Известно, что процесс усвоения микроэлементов происходит в тонком кишечнике путем активного транспорта, который представляет собой присоединение свободного иона к транспортному белку, позволяющее переносить его в кровоток. Так случается со всеми минеральными веществами, попадающими в наш организм. Этот процесс называется «органической хелацией». Если данный процесс

по какой-то причине не происходит, то минерал не усваивается.

Элементы из неорганических соединений при попадании в организм с пищей обладают уровнем биодоступности не более 2-20% и часто при длительном употреблении оказывают негативное влияние на организм.

Эффективность усвоения микроэлементов из хелатных соединений зависит от их констант устойчивости. Установлено, что максимальная эффективность усвоения наблюдается в том случае, когда константа устойчивости хелата выше, чем у соединений микроэлемента с компонентами пищи или корма, и ниже, чем у его соединений в тканях организма. В этом случае хелатирующий агент транспортирует связанный элемент из пищи (корма) через кишечную стенку и отдает тканям. Кроме того, при потреблении хелатов частично или полностью стирается антагонизм между элементами, а также ингибируются многочисленные пищевые факторы, отрицательно влияющие на абсорбцию биоэлементов. Это позволяет сокращать дозы потребления микроэлементов в 3-4 раза и получать тот же биологический эффект.

Исследования показывают, что хелатные соединения легко усваиваются, и организм при необходимости может без вреда для себя переносить большие дозы микроэлементов, которые при потреблении в виде неорганических солей являются токсичными.

Механизм положительного влияния микроэлементов в хелатной форме связан с тем, что они имеют меньшую реакционную способность по сравнению с ионами металлов, что исключает образование неусваиваемых или мало усваиваемых соединений и обеспечивает более активное включение в соответствующие

биологические циклы и значительно большие сроки сохранности обогащенных ими продуктов и кормов.

Так, многие неорганические соединения несовместимы с органическими кислотами и солями других металлов, таких как медь, марганец, железо, цинк и другие. Например, йод в неорганической форме в присутствии сернистой меди быстро реагирует с ней, в результате чего часть йода улетучивается, а другая часть связывается с медью, превращаясь в плохо усвояемую йодистую медь. Йод и большинство металлов (железо, медь, цинк и т.п.) оказывают сильное разрушающее действие на жиры, витамины и другие биологически активные вещества, содержащиеся в пище и кормах.

Известно, что большинство неорганических соединений микроэлементов нестабильны. При обогащении продуктов и кормов они легко окисляются или восстанавливаются. Например, неорганические соединения йода под влиянием света и влажности распадаются, и йод улетучивается. Потери йода из йодированной соли уже через 1 неделю хранения могут достигать более 50%, а потери йода из йодированного комбикорма за 2 мес. хранения составляют более 70%.

Установлено, что хелатные комплексы способны не только активизировать в организме важнейшие ферментные системы, но и оказывают стимулирующее действие на синтез белка, обладают ярко выраженными антиоксидантными свойствами, способствуют уменьшению интоксикации организма тяжелыми металлами.

Сегодня наиболее широко хелатные соединения применяются в животноводстве. Установлено, что использование хелатных соединений повышает усвоение микроэлементов, позволяет более

точно нормировать их, поддерживает здоровье животных, их продуктивные и воспроизводительные качества. Кроме того, в результате такого подхода значительно сокращается концентрация микроэлементов в побочной продукции животноводства, что существенно снижает загрязнение окружающей среды. В связи с высокими требованиями экологов в странах с развитым животноводством (США, Германия, Франция) продолжают вестись активные работы по введению хелатных соединений в корма животных.

Большой интерес к этому направлению наблюдается и в России. Президиум РАСХН в 2009 г. одобрил направление инновационных исследований по использованию в рационах с.-х. животных и птицы органических форм микроэлементов при производстве функциональных пищевых продуктов.

Несмотря на высокую эффективность и безопасность хелатных форм микроэлементов, применение их в медицине и пищевой промышленности не столь велико. В этих отраслях данный подход не нашел широкого практического применения по следующим основным причинам:

1. Сильный разброс массового содержания элементов в органической форме, а также наличие в хелатных соединениях больших остаточных количеств неорганических соединений не позволяют обеспечить их нормирование при производстве лекарственных средств и обогащенных продуктов питания.

2. В технологическом процессе органической хелатации элементов происходит загрязнение хелатов химическими реагентами и продуктами реакции, что может вызвать побочные эффекты при их применении.

3. Отсутствие промышленного био-

технологического оборудования и процессов (ультра- и нанофильтрации, сублимации и т.д.) не позволяет обеспечить физико-химические свойства и чистоту получаемых хелатных соединений.

Сотрудниками ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» разработаны и апробированы инновационные технологии получения различных макро- и микроэлементов в органической форме. Применение современных биотехнологических методов и оборудования позволяют производить в промышленных масштабах хелатные соединения, идентичные природным биогенным формам йода, кальция, железа, меди, цинка, магния и других элементов.

Проведенные многочисленные лабораторные и клинико-нутрициологические исследования с ведущими институтами РАМН и РАСХН выявили высокую эффективность и безвредность применения БАД к пище и продуктов питания, обогащенных органическими соединениями эссенциальных элементов, для профилактики основных алиментарно-зависимых дефицитных состояний детей и взрослых [3, 5].

Металлохелатные комплексы

Почти все катионы, кроме натрия, калия и небольших количеств кальция и магния, после всасывания связываются в организме с какой-либо органической матрицей: белками, пептидами, аминокислотами, гормонами, ферментами, метаболитами, шаперонами или нуклеиновыми кислотами. Свободные катионы в организме встречаются редко и в некоторых случаях токсичны. В желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) элементы также соединяются и с некоторыми другими матрицами, в т.ч. с водой. Поскольку большая часть комплексов является рН-

чувствительными, тот или иной элемент может соединяться и вновь диссоциировать с двумя или более матрицами до его абсорбции по мере прохождения по ЖКТ.

Координационная химия, или химия хелатирования, возникла в 1893 г., когда Вернер изучал поведение этилендиамина в комплексе хлорида платины (II) с бис-(этилендиамин) [21]. Полученные координационные комплексы имели различные геометрические формы, зависящие от координационного числа и степени окисления.

Для образования хелата необходим лиганд, в котором число донорных центров, образующих связь с центральным атомом, не меньше двух. Число таких центров называют дентатностью лиганда. Лиганды, образующие хелатные циклы, называются хелатирующими (хелатообразующими) реагентами. Примеры полидентатных лигандов: этилендиамин ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), глицерин ($\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$), этилендиаминотетрауксусная кислота. Образование химических связей между полидентатным лигандом и центральным атомом называется хелатированием, или хелатообразованием. Хелатообразование — один из путей образования супрамолекулярных комплексов «гость-хозяин». Наиболее обширный и важный класс хелатов — хелатные комплексы металлов (металлохелаты). Способность координировать лиганды присуща металлам всех степеней окисления. Хелаты значительно устойчивее, чем близкие по природе комплексы, образованные монодентатными лигандами. Это явление называют хелатным эффектом. Во многом благодаря наличию хелатного цикла хелаты обладают уникальными физическими, химическими и биологическими свойствами.

Комплексы из двух и более групп отдельных органических соединений, координированные с центральным катионом так, что образуется кольцо, называются хелатами. Органическая составляющая хелата называется лигандом и имеет координационные функциональные группы, отделенные двумя или тремя атомами обычно углерода. Итоговое кольцо, включающее неорганический ион, обычно состоит из пяти или шести членов (рис. 1).

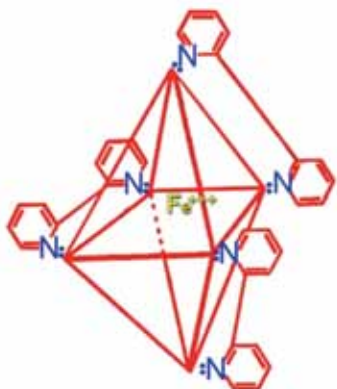


Рис. 1. Комплекс с тремя координационными группами в хелате с железом. Лигандом хелата является 2,2' — дипиридамин.

Чтобы произошло хелатирование, лиганд должен содержать, по крайней мере, 2 донорных атома, способных связываться с одним и тем же атомом металла. Относительное сродство, с которым микроэлементы соединяются со многими хелатирующими агентами, кажется почти независимой от природы органической составляющей.

Элементы, получаемые с пищей в неорганической форме или как часть растительных и животных тканей, присутствуют в виде комплексов. Они могут диссоциировать и вновь соединяться с лигандами по мере прохождения пищи из кислой среды желудка к более нейтраль-

ным условиям тонкого кишечника. Эндогенная секреция некоторых элементов также вносит свой вклад в общий пул находящихся в тонком кишечнике элементов, доступных для комплексообразования и реабсорбции. Процесс абсорбции может включать образование одного или более комплексов на щелочной каемке эпителиальных тканей, в клетках слизистых оболочек или на серозных мембранах. Некоторые комплексы обязательны для активной диффузии или активного транспорта, а другие могут снижать или подавлять абсорбцию элементов. Металлы необходимы для функционирования многих жизненно важных метаболических систем.

Большую роль естественные хелаты (гемоглобин, хлорофилл, витамин В12 и др. соединения) играют в процессах жизнедеятельности.

Роль некоторых макро-, микроэлементов, содержащих их белков и витаминов в организме человека

Магний

Магний (Mg) — щелочно-земельный металл, широко распространен в природе. В виде оксида магния используется в медицине как нейтрализующее средство при повышенной кислотности желудочного сока, сульфат магния в виде кристаллогидрата (английская соль) используется как спазмолитическое, желчегонное, слабительное и успокаивающее средство. Хлорид Mg используется в составе лечебных ванн. Многие соли Mg используются при изготовлении биологически активных добавок к пище и лекарственных препаратов, которые применяются при лечении хронических стрессов, заболеваниях сердечно-сосудистой системы [16]. В организме человека содержится около 140 г Mg, причем 2/3 от этого ко-

личества содержится в костной ткани, а главным депо являются костная ткань и мышцы. Mg как важнейший внутриклеточный элемент в обменных процессах взаимодействует с калием, кальцием и натрием и участвует как активатор во многих ферментативных реакциях. Нормальный уровень Mg необходим для обеспечения жизненно-важных процессов, регуляции нервно-мышечной проводимости, тонуса гладкой мускулатуры и для восстановления сил после тяжелых физических нагрузок.

Mg в организме выполняет самые разнообразные функции: участвует в синтезе и обмене белков, жиров и углеводов, в переносе, хранении и утилизации энергии, в митохондриальных процессах и в регуляции нейрохимической передачи и мышечной возбудимости, уменьшая возбудимость нейронов и замедляя нейромускульную передачу. Mg является физиологическим антагонистом кальция, препятствуя поступлению ионов кальция через пресинаптическую мембрану. Mg контролирует баланс внутриклеточного калия, снижает количество ацетилхолина в нервной ткани, расслабляет гладкую мускулатуру, снижает артериальное давление при его повышении, угнетает агрегацию тромбоцитов, повышает осмотическое давление в просвете кишечника и ускоряет пассаж кишечного содержимого. Mg является кофактором ферментативных реакций.

Период полувыведения Mg из организма — 120 сут.

Железо

Железо (Fe) — блестящий серебристо-белый металл, известен со времен древних цивилизаций. Основная функция в организме — перенос кислорода и участие в окислительных процессах (при помощи десятков железосодержащих

ферментов). Fe содержится в составе гемоглобина, миоглобина, в цитохромах, но большая его часть содержится в эритроцитах и клетках мозга. Сульфат Fe в медицине используется для лечения малокровия. Препараты Fe используются для профилактики и лечения железодефицитных анемий и хронических постгеморрагических анемий. Многочисленные комплексные препараты разработаны для усиления всасывания Fe из ЖКТ, улучшения синтеза железосодержащих метаболитов (гемоглобина), стимуляции эритропоэза. Хлорид Fe используется как компонент кровоостанавливающих средств.

Период полувыведения Fe из организма — 2000 сут. Среднее содержание в волосах — 10,1 мг/кг, крови — 447 мг/л, мышцах — 180 мг/кг.

Поскольку в состав большинства ферментов входят ионы металлов (железо, медь, марганец, кобальт), наиболее оптимальным приемом для их изучения является электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) (рис. 2, 3).

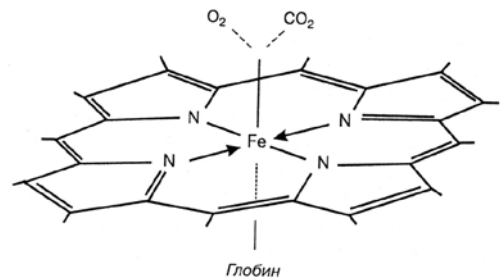


Рис. 2. Классическая рентгеноструктурная модель гема.

На рис. 3 изображен гем, т.е. порфириновое кольцо с атомом железа в центре; через пятую координационную связь к гему присоединяется глобин, через шестую — группа X (кислород, двуокись углерода и т.д.). По своей сути,

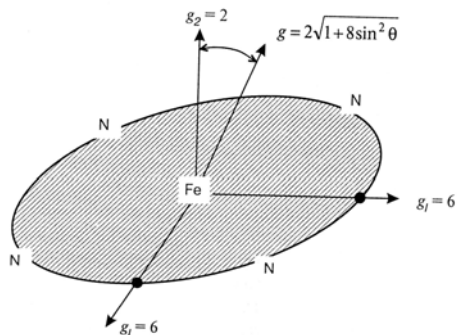


Рис. 3. Структура гема на основе ЭПР-спектроскопии. G-фактор отражает электронно-магнитный резонанс для свободного неспаренного электрона или неспаренного электрона, связанного с атомом или молекулой. Зависимость значения g-фактора у высокоспинового производного гемоглобина составляет в плоскости гема 6,0 во всех направлениях.

положение точки парамагнитного резонанса характеризует синглетную линию поглощения. Это означает, что значение поля, при котором имеет место резонанс, определяет величину g-фактора для данного свободного или связанного с атомом или молекулой неспаренного электрона.

В гемоглобине содержатся 4 гема, а, значит, и 4 атома Fe на молекулу, а в миоглобине — только один гем.

С этой точки зрения всесторонне изучены свойства ферментативных реакций ксантиноксидаз, альдегидоксидаз, дегидрогеназ, каталаз, пероксидаз, цитохромоксидаз и др. Исследованы гем и его окружение. Достаточно напомнить, что гем входит в состав пероксидазы, каталазы, цитохромов и многих других биологических молекул.

Стоит подчеркнуть, что перечисленные выше ферменты и многие другие белки являются естественными биохимическими маркерами генов и широко используются для фенотипирования и определения этнической принадлежности человека к той или иной популяции, а

также для генотипирования спортсменов.

Современный спорт высших достижений, где борьба идет за сотые доли секунды, граммы и сантиметры, предъявляет высочайшие требования не только к уровню физической подготовки спортсмена и его психологической устойчивости, но и к процессам обеспечения и утилизации энергии. Fe, как составная часть гемоглобина и миоглобина, участвует в переносе и обеспечении кислородных резервов в мышцах, в составе цитохромов при аэробном образовании энергии во всех клетках организма. Fe участвует в продукции и удалении свободных радикалов, в процессах пролиферации тканей и иммунной защиты. При железодефицитных состояниях уже с ранних стадий у спортсменов отмечается угнетение аэробного энергообразования в тканях, усугубляющееся гемической гипоксией. В результате этих сдвигов снижается физическая работоспособность, главным образом, по аэробным характеристикам, ограничиваются возможности оперативного восстановления, снижается тонус скелетной мускулатуры. Комплекс физиологических изменений, вызванный дефицитом Fe, резко ограничивает профессиональные возможности атлета и достижение им высоких спортивных результатов. Избыточное накопление Fe в организме вызывает у спортсменов гемическую гипоксию при анемическом синдроме (сидеробластную анемию, гемохроматоз, приводящие к циррозу печени, панкреатиту с клиникой сахарного диабета, артриту-артрозу, микардиодистрофии).

Цинк

Цинк (Zn) — голубовато-белый металл. В организме взрослого человека содержится 1,5-3 г Zn. Оптимальная интенсивность поступления Zn в организм — 10-15 мг в день. Содержание Zn в мыш-

цах — 240 мг/кг, в крови — 7 мг/л. Порог токсичности — 600 мг в день. Период полувыведения из организма — 245 суток.

Являясь кофактором многих ферментов, Zn принимает участие в формировании Т-клеточного иммунитета. Сульфат Zn используется в медицине в качестве компонента фармпрепаратов для лечения дефицита Zn, болезней кожи, волос, ногтей, цирроза печени, иммунодефицитных состояний и др. Улучшают усвоение Zn витамины А и В6. Препятствуют усвоению его медь, марганец, железо и в больших дозах кальций.

Zn обладает детоксицирующим действием — способствует удалению из организма двуокиси углерода. В процессе занятий спортом Zn способствует очищению крови от накапливающегося в ней лактата, и, кроме того, добавки Zn (25 мг в день) повышают иммунитет в периоды интенсивной физической нагрузки в тренировочном и соревновательном режимах.

Медь

Медь (Cu) — металл с высокой электрохимической активностью. Оптимальная интенсивность поступления Cu в организм — 2-3 мг/сут. Содержание ее в мышцах — 10 мг/кг, в крови — 1,01 мг/л. Максимальная концентрация Cu — в печени, почках и мозге. В сыворотке крови медь до 95% связана с церуллаплазмином и до 5% — с альбумином. Ведущую роль в метаболизме Cu играет печень, где синтезируется белок церулоплазмин, который обладает высокой активностью многих ферментов и участвует в гомеостазе Cu. Порог токсичности — 200 мг/сут. Токсичность меди проявляется, в основном, за счет свободных ионов ее в плазме. Как противомикробное и прижигающее средство в медицине применяется серноокислая Cu. При гипохромной анемии применяется Cu в сочетании с Fe.

Для профилактики и лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата у спортсменов используются препараты Cu.

Cu как жизненно важный элемент содержится в составе витаминов, гормонов, дыхательных пигментов и, следовательно, принимает активное участие в процессах обмена веществ и тканевом дыхании. Адсорбируется в желудке и тонком кишечнике. Cu играет важную роль в регуляции окислительно-восстановительных, нейроэндокринных процессов, кроветворения, пигментации кожи и волос. Участвует в выработке гормона щитовидной железы тироксина и формировании соединительной ткани, составляющей основу опорно-двигательного аппарата, кожи. Cu обладает выраженным противовоспалительным свойством, смягчает проявление аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит), способствует усвоению Fe.

Также она участвует в регуляции процессов биологического окисления и генерации АТФ, в синтезе гемоглобина и важнейших белков соединительной ткани — коллагена и эластина, в обмене Fe, в защите клетки от токсического воздействия активированного кислорода.

Медь необходима для нормального усвоения витамина С. Дефицит Cu может быть одной из причин *спортивной анемии*, он отрицательно сказывается на кроветворении, функциях щитовидной железы (часто развивается гипотиреоз), на всасывании Fe, состоянии соединительной ткани, процессах миелинизации в нервной системе, усиливает предрасположенность к бронхиальной астме, алергодерматозам, кардиопатиям, витилиго и многим другим заболеваниям.

Повышенное содержание Cu в организме у спортсменов отмечается при острых и хронических воспалительных

заболеваниях, а также при наличии у них бронхиальной астмы, заболеваний почек и печени. Хроническая интоксикация Cu и ее солями может встречаться у пловцов (в связи с окрашиванием воды медным купоросом и другими солями меди) и приводить к функциональным расстройствам нервной системы, печени и почек, изъязвлению и перфорации носовой перегородки, сухости кожи и даже к аллергодерматозам. Избыток элемента приводит к дефициту цинка и молибдена.

При нарушении обмена Cu происходит усиление перекисного окисления липидов, что ускоряет процесс старения организма. Кроме того, ее недостаток усиливает предрасположенность к развитию диабета, приводит к задержке роста, развитию анемии, потере веса, накоплению холестерина, атрофии сердечной мышцы, остеопорозу, кожным заболеваниям, потере волос, утомляемости и частым инфекциям.

Церулоплазмин — медьсодержащий белок (гликопротеин), присутствующий в плазме крови. В церулоплазмине содержится около 95% общего количества Cu сыворотки крови человека [1]. Врожденный дефицит церулоплазмينا приводит к дефектам развития головного мозга и печени.

Церулоплазмин человека, благодаря входящим в его состав ионам Cu, имеет голубой цвет. Средняя молекулярная масса колеблется в диапазоне 150000-160000 г/моль. На одну молекулу приходится 6-7 ионов Cu^{2+} .

До внедрения Cu в белок он называется апоцерулоплазмин, после — холоцерулоплазмин.

Основные аминокислоты церулоплазмينا: аспарагиновая, глутаминовая, треонин, глицин, лейцин.

Церулоплазмин обнаруживается не только в плазме человека и приматов, но и у свиньи, лошади, козы, оленя, собаки, кошки и др. животных. Белок играет важную ферментативную роль — он катализирует окисление полифенолов и полиаминов в плазме.

Синтез церулоплазмينا в печени осуществляют гепатоциты, скорость этого процесса регулируется гормонами. На протяжении всей жизни уровень этого белка в плазме остается стабильным, за исключением неонатального этапа и периода беременности у женщин.

Церулоплазмин не проникает или слабо проникает через гематоэнцефалический барьер. В мозге человека белок производится определенными популяциями глиальных клеток, связанных с микрососудами, а в сетчатке глаза — клетками внутреннего нуклеарного слоя. Астроцитами синтезируется особая форма церулоплазмينا, порожденная альтернативным сплайсингом и содержащая GPI-якорь, она предположительно необходима для выведения Fe из клеток центральной нервной системы.

У мышей, нокаутных по церулоплазмину, отмечается отложение Fe в мозжечке и стволе мозга, потеря дофаминергических нейронов, нарушение двигательной координации.

Марганец

Марганец (Mn) — твердый, хрупкий металл серебристо-белого цвета, содержится в пищевых продуктах (ржаной хлеб, пшеничные и рисовые отруби, в овощах и фруктах и в некоторых лекарственных растениях). Всасывается Mn в тонком кишечнике, быстро покидает кровяное русло и находится, главным образом, в митохондриях клеток, в которых вырабатывается энергия. Наибольшее количество его находится в печени,

поджелудочной железе, почках и в трубчатых костях. Волосы содержат 0,5-1,5 мкг/г, кости — 0,2-100 мг/кг, мышцы — 0,1-2,3 мг/кг.

Среднесуточная потребность в Mn — 2-5 мг. Порог токсичности — 40 мг в день. Период полувыведения из организма — 4-40 сут.

Являясь одним из важнейших биоэлементом и компонентом множественных ферментов, Mn выполняет многочисленные функции в организме. Он участвует в синтезе и обмене нейромедиаторов в нервной системе; в обмене гормонов щитовидной железы; в регуляции обмена витаминов С, Е, группы В, холина и Cu; в обеспечении полноценной репродуктивной функции. Обеспечивает нормальное функционирование мышечной ткани и развитие соединительной ткани, хрящей и костей. Усиливает гипогликемический эффект инсулина, повышает гликолитическую активность и интенсивность утилизации жиров. Препятствует свободнорадикальному окислению, обеспечивает стабильность структуры клеточных мембран, снижает уровень липидов и противодействует жировой дегенерации печени, участвует в регуляции углеводного и липидного обмена и стимулирует биосинтез холестерина.

Дефицит Mn приводит к различным патологическим процессам в организме — снижению выработки антител, нервно-психическим расстройствам, задержкам развития и, как правило, сопровождается сахарный диабет и др. заболевания.

В медицине в виде перманганата калия применяется как дезинфицирующее средство и противоядие для боевых отравляющих веществ и цианидов. Органические соединения Mn используются в

минерально-витаминных комплексах для лечения и профилактики различных аллергических заболеваний.

У спортсменов дефицит Mn может приводить к нарушению углеводного обмена по типу инсулиннезависимого диабета, гипохолестеремии, задержке роста волос и ногтей, повышению судорожной готовности, аллергиям, дерматитам, нарушению образования хрящей, остеопорозу. При развитии остеопороза прием кальция усугубляет дефицит Mn, так как затрудняет его усвоение в организме. Кишечной абсорбции препятствуют также фосфаты и Fe.

При хронической интоксикации Mn характерными являются астенические расстройства: повышенная утомляемость, сонливость, снижение активности, круга интересов, ухудшение памяти. Избыток Mn усиливает дефицит Mg и Cu. В балансовых исследованиях взрослых спортсменов высокой квалификации в зимний период тренировки установлено, что в день кроссового бега на 30 км содержание Fe, Cu и Mn в рационах находилось на нижней границе физиологической нормы для лиц, не занимающихся спортом. Под воздействием большой физической нагрузки выделение микроэлементов через кишечник и почки значительно превышало их поступление с пищей. Баланс всех трех микроэлементов был отрицательным. За три дня отдыха после пробега на фоне недостаточного по микроэлементам питания потери Fe и Cu не компенсировались. Обогащение рационов комплексом микроэлементов сопровождалось значительной задержкой Fe, Cu и Mn в организме спортсменов.

Кобальт

Кобальт (Co) является жизненно необходимым элементом для животных и человека, в организм он поступает с пи-

щей, очень много Со в печени, молоке и в овощах. До 20% Со всасывается в ЖКТ, интенсивность его поступления — 20-50 мкг/сут. Мышцы содержат 0,28-0,65 мг/кг, кости — 0,01-0,04 мг/кг. Период полувыведения из организма — 30-40 лет. Порог токсичности — 500 мг/сут.

В составе молекулы цианокобаламина он активно участвует в ферментативных процессах, угнетает обмен йода. Со повышает усвоение Fe и синтез гемоглобина и стимулирует эритропоэз, участвуют в транспортировке кислорода в организме человека.

Только при нормальном взаимодействии Со, Си и Fe осуществляется процесс кроветворения у животных и человека. Со входит в состав витамина В12, который человек получает, в основном, из животной пищи. Со активизирует деятельность некоторых ферментов, участвует в секреции гормонов инсулина и адреналина, стимулируя деятельность желез внутренней секреции. Он также способствует накоплению в организме ряда витаминов и стимулирует синтез белка для строительства мышц. В медицине Со используется для профилактики и лечения постгеморрагических и железодефицитных анемий, при анемиях, вызванных токсическими и лекарственными веществами, при многих заболеваниях нервной системы и др. Период полувыведения из организма 30-40 лет.

Йод

Йод (I) — твердый черный неметалл, в природе встречается в виде солей — йодидов и йодатов, а в морской соли — в виде йодистого Na и Mg. Оптимальная интенсивность поступления его в организм — 100-150 мкг в день, а порог токсичности — 5 мг в день. Основные источники для человека — морепродукты, йодофоры. Всасывается в тонком ки-

шечнике, период полувыведения из организма — 138 сут.

В норме в организме человека его содержится 15-25 мг, и почти половина — в щитовидной железе (1000-12000 мкг/г). В мышцах — 0,05-0,5 мг/кг, в костях — 0,27 мг/кг. Токсическая доза для человека — 2 мг, летальная — 35-350 г.

В организме принимает участие в регуляции скорости биохимических реакций, в регуляции обмена энергии, температуры тела, белкового, жирового, водно-электролитного обмена, в регуляции обмена некоторых витаминов, дифференцировки тканей, процессов роста и развития организма, в т.ч. нервно-психического, и повышает потребление кислорода тканями. Витамины А, Е, кобальт, марганец, кальций, стронций, железо, цинк и медь способствуют более полному усвоению йода тканями. Фтор, бром и хлор конкурируют с йодом при усвоении и участии в биохимических реакциях [24].

Витаминами В₁₂ называют группу Со-содержащих биологически активных веществ, называемых кобаламинами. К ним относят собственно *цианокобаламин* (продукт, получаемый при химической очистке витамина цианидами), гидроксикобаламин и две коферментные формы витамина В₁₂ (метилкобаламин и 5-дезоксиаденозилкобаламин).

В более узком смысле витамином В₁₂ называют цианокобаламин, т.к. именно в этой форме в организм человека поступает основное количество витамина В₁₂. Но всё же он не является синонимом В₁₂, и несколько других соединений также обладают В₁₂-витаминной активностью, цианокобаламин — лишь один из них.

В₁₂ имеет самую сложную по сравнению с другими витаминами структуру, основой которой является корриновое кольцо. Коррин во многом аналогичен

порфирина (сложной структуре, входящей в состав гема, хлорофилла и цитохромов), но отличается от порфирина тем, что два пиррольных цикла в составе коррина соединены между собой непосредственно, а не метиленовым мостиком. В центре корриновой структуры располагается ион Co . 4 координационных связи Co образует с атомами азота. Ещё одна координационная связь соединяет Co с диметилбензимидазольным нуклеотидом. Последняя, шестая координационная связь Co остаётся свободной: именно по этой связи и присоединяется цианогруппа, гидроксильная группа, метильный или 5'-дезоксиаденозильный остаток с образованием 4-х вариантов витамина B_{12} , соответственно. Ковалентная связь C-Co в структуре цианокобаламина — единственный в живой природе пример ковалентной связи металл-углерод.

Ковалентная связь C-Co кофермента B_{12} участвует в двух типах ферментативных реакций — реакции переноса метильной группы $-\text{CH}_3$ между двумя молекулами.

В организме человека есть только два фермента с коферментом B_{12} — метилмалонил-КоА-мутаза (фермент, катализирующий перестановку атомов в углеродном скелете, в цепи реакций биологического окисления белков и жиров) и 5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин-метилтрансфераза (фермент, который катализирует превращение аминокислоты гомоцистеина в аминокислоту метионин).

Целью данного исследования являлась оценка токсических, максимально переносимых и летальных доз хелатных соединений при однократном внутрижелудочном введении самцам и самкам лабораторных аутбредных мышей.

Информация, полученная в ходе данного исследования, не дублирует результаты

исследований, проведенных ранее. Диапазон доз для исследования острой токсичности позволил оценить токсичность препаратов при однократном введении.

Нормативные ссылки

Данное исследование было выполнено в соответствии с:

— Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»;

— Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»;

— Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [14];

— Руководством по проведению клинических исследований лекарственных средств [13];

— Guide for the care and use of laboratory animals [22].

Проведение научно-исследовательской работы сопровождалось выполнением следующих стандартных операционных процедур (СОП):

СОП ЭЖ-МВ-4v1 (фиксация лабораторного животного для проведения внутрижелудочного введения);

СОП ЭЖ-МР-11v1 (регистрация сроков развития интоксикации и гибели животных);

СОП ЭЖ-П-6v1 (взвешивание мелких лабораторных животных);

СОП ЭЖ-МР-12v1 (клинический осмотр лабораторных животных);

СОП ЭЖ-Т-4v1 (взвешивание органов лабораторных животных);

СОП ЭЖ-Т-2v1 (эвтаназия лабораторных животных);

СОП ЭЖ-П-4v1 (маркировка клеток содержания лабораторных животных);

СОП ЭЖ-П-10v1 (рандомизация экс-

периментальных животных методом модифицированной блочной рандомизации);

СОП ЭЖ-П-8v1 (формирование групп);

СОП ДЗ-7v1 (подготовка доз для введения) [6].

Список сокращений

GLP — «Good Laboratory Practice», надлежащая лабораторная практика;

ЛД50 — среднесмертельная доза;

f — female, самка;

m — male, самец;

в/ж — внутрижелудочно;

ТД — терапевтическая доза;

ЛД — летальная доза.

Материалы и методы

Акклиматизация и отбор животных для исследования

Лабораторные животные до начала исследования проходили 14-дневную адаптацию при групповом содержании в клетках. Во время этого периода ежедневно контролировали клиническое состояние животных путем визуального осмотра. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями исключались.

Распределение по группам

Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп отбор животных осуществлялся при помощи метода модифицированной блочной рандомизации. Для этого всех поступивших из питомника животных случайным образом помещали в ячейки блока рандомизации (число ячеек блока рандомизации кратно числу групп в эксперименте). Далее, пользуясь генератором случайных чисел (статистическая программа Statistica 6.0), получали перечень данных, содержащий номера ячеек с животными и соответствующие им номера групп, куда в дальнейшем были размещены животные.

Идентификация животных

Маркировка клетки кодировала пол животных, дату начала введения тестируемых средств, название группы. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер.

Содержание животных

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)». В период акклиматизации и эксперимента животные были размещены в вентилируемых клетках RairIsoSystem, группами по 5 особей [12].

В качестве подстила использовались стерилизованные опилки из нехвойных пород деревьев.

Брикетируемые комбикорма для лабораторных животных давались *ad libitum* в кормовое углубление клетки. Данные о составе и качестве корма от производителя хранятся в документации лаборатории.

Животным давалась очищенная вода *ad libitum*.

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (22-24°C и при относительной влажности воздуха 60-70%). В комнатах содержания животных поддерживался 12-час цикл освещения. Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Никаких существенных отклонений этих параметров в период акклиматизации и в ходе эксперимента не произошло.

Получение комплексов хелатов микроэлементов

Комплексы с микроэлементами (Mg, Zn, Mn, Cu и Co) получали с применением ферментативных гидролизатов концентратов сывороточных белков молока. С целью повышения содержания микроэ-

лементов в хелатах и увеличения их биодоступности для производства хелатных комплексов использовали гипоаллергенную низкомолекулярную фракцию (<10 кД) гидролизатов сывороточных белков молока, полученную с помощью ультрафильтрации (табл. 2).

Таблица 2

Молекулярно-массовое распределение белков сыворотки молока и их гидролизатов

Продукт	>10 кД	3-10 кД	<3 кД
Концентрат белков сыворотки молока	82,5%	8,79%	8,71%
Гидролизат белков сыворотки молока	2,03%	54,93%	43,04%

Хелатные комплексы с Mg, Zn, Mn, Cu и Co получали путем совместной инкубации водных растворов солей микроэлементов с гидролизатом сывороточных белков молока. Инкубацию проводили при pH=7,1-7,2 при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Затем отделяли осадок (в случае его образования) фильтрацией. После этого реакцию смесь подвергали нанофильтрации для удаления не связавшихся неорганических катионов. Полученные жидкие хелаты лиофильно высушивали и определяли в них содержание микроэлементов атомно-абсорбционным методом.

Методики проведения наблюдений

Масса тела

Масса тела регистрировалась непосредственно перед введением и эвтаназией для расчета процентного отношения массы органов к массе тела.

Клинические наблюдения

Клинический осмотр каждого животного проводился в течение первого часа

после введения препарата и ежедневно в последующем. В случае стремительного развития неблагоприятных признаков — не менее 2-х раз в день.

Выполняли подробный осмотр животного в клетке содержания, в руках и на открытой площадке. Отмечали проявление и выраженность, где приемлемо, признаков интоксикации. Фиксировали общее состояние животных: особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координацию движений, тонус скелетных мышц, реакцию на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, органов чувств, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания и окраску мочи. Фиксировали клиническую картину интоксикации и время гибели животных.

Осмотр животных в клетках содержания, с целью выявления клинической патологии и смертности, производили ежедневно.

Ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус животных изучали в конце эксперимента для регистрации отсроченных влияний.

Расчет ЛД₅₀

Расчет ЛД₅₀ осуществлялся по методу В.Б. Прозоровского. Сравнение показателей ЛД₅₀ групп самок и самцов, получавших исследуемые вещества, осуществлялось с помощью t-критерия Стьюдента. Сравнение значений ЛД₅₀ осуществлялось попарно: самцы – самки [9].

Патоморфологические исследования

Животные были подвержены полной некропсии с оценкой внешней поверхности тела, всех проходов, черепной, грудной, брюшной полостей и их содержимого.

Органы, извлеченные при некропсии, были взвешены, парные органы взвешивались вместе. Данный показатель был использован для расчета процентного отношения массы органов к массе тела.

Органы, подлежащие взвешиванию: сердце, легкие с трахеей, тимус, печень, селезенка, почки, надпочечники, головной мозг [23].

У умерших животных или животных, подвергнутых незапланированной эвтаназии, органы не взвешивались.

Коллекция органов

При некропсии были взяты органы (фрагменты) и ткани, указанные ниже, и зафиксированы в 10% рН-нейтральном формалине. А именно: легкие с трахеей, печень, почки, желудок, тонкий кишечник, головной мозг.

Гистология

Микроскопический анализ органов и тканей лабораторных животных проводился в следующих случаях:

1) гибель животного на 2-14 день после введения вещества;

2) обнаружение в процессе некропсии, в том числе у животных, погибших в первые сутки после введения веществ, измененного внутреннего органа (в данном случае исследовалась только ткань измененного органа).

Ткани, подлежащие гистологической обработке, были очищены, залиты в парафин, нарезаны, окрашены гематоксилином и эозином и микроскопированы.

Анализ данных

Для всех полученных данных применена описательная статистика, проверка на нормальность распределения. Тип распределения определялся критерием Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения были подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые вместе со значением n представ-

лены в итоговых таблицах.

Межгрупповые различия анализировались параметрическими методами. В качестве параметрического критерия использован критерий Стьюдента для зависимых и независимых переменных для множественных сравнений. Различия определены при 0,05 уровне значимости. Статистический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения «Статистика 6.0» [17].

Экспериментальные животные

Аутбредные мыши, полученные из филиала ФГБУН НЦБМТ ФМБА «Андреевка», в количестве по 230 самцов и самок. Масса животных к началу исследования составляла 19-21 г.

В резерве имелось дополнительно по 30 особей обоего пола на случай необходимости замены в течение периода акклиматизации.

Дизайн исследования

После акклиматизационного периода были сформированы группы животных соответственно дизайну эксперимента.

Период наблюдения составлял 14 суток. За сутки перед некропсией животных лишали корма, доступ к воде при этом не ограничивался.

Эвтаназия осуществлялась на 15-е сутки с помощью декапитации. Затем вскрывалась грудная клетка.

Способ и процедура введения

В данном исследовании применялось внутрижелудочное введение, аналогичное рекомендованному для людей и позволяющее ввести большее количество препарата с целью проведения оценки острой токсичности.

Исследуемые вещества вводились однократно, внутрижелудочно, в соответствующих дозах. Объемы введения были лимитированы видом и массой животных.

Результаты и их обсуждение
Токсикометрия

В ходе проведенного эксперимента были определены различные значения ле-

тальных доз для тестируемых хелатных соединений. Зависимые от доз летальные эффекты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Летальные эффекты хелатных соединений при в/ж введении мышам

Группы животных	Объем введения, мл	Доза, мг/кг, *летальные эффекты (пало/всего)		
Контроль, самцы	1	—	—	—
		*0/10	0/10	0/10
Контроль, самки	1	—	—	—
		*0/10	*0/10	*0/10
Zn-хелат, самцы	1	250	500	750
		*2/10	*6/10	*7/10
Zn-хелат, самки	1	250	500	750
		*3/10	*4/10	*6/10
ЛД для Zn-хелата		25	50	60
Mg-хелат, самцы	1	1000	1500	2000
		*3/10	*5/10	*7/10
Mg-хелат, самки	1	1000	1500	2000
		*4/10	*6/10	*9/10
ЛД для Mg-хелата		33	50	80
Mn-хелат, самцы	1	100	200	300
		*1/10	*3/10	*7/10
Mn-хелат, самки	1	100	200	300
		*2/10	*4/10	*5/10
ЛД для Mn-хелата		15	33	60
Cu-хелат, самцы	1	100	200	300
		*2/10	*4/10	*9/10
Cu-хелат, самки	1	100	200	300
		*2/10	*6/10	*9/10
ЛД для Cu-хелата		20	50	90
Co-хелат, самцы	1	200	300	400
		*3/10	*5/10	*9/10

Со-хелат, самки	1	200	300	400
		*2/10	*5/10	*7/10
ЛД для Со-хелата		27	50	80
I-хелат, самцы	1	500	1000	1500
		*0/10	*0/10	*0/10
I-хелат, самки	1	500	1000	1500
		*0/10	*0/10	*0/10
ЛД для I-хелата		0	0	0
Fe-хелат, самцы	1	1000	1500	2000
		*0/10	*1/10	*2/10
Fe-хелат, самки	1	1000	1500	2000
		*0/10	*0/10	*2/10
ЛД для Fe-хелата		0	5	20
Микс-1, самцы	2	Zn-хелат – 500 мг/кг, Mg-хелат – 1500 мг/кг, Mn-хелат – 200 мг/кг, Cu-хелат – 200 мг/кг, Со-хелат – 300 мг/кг, I-хелат – 1000 мкг/кг, Fe-хелат – 1000 мг/кг		
		*0/10		
Микс-1, самки	2	Zn-хелат – 500 мг/кг, Mg-хелат – 1500 мг/кг, Mn-хелат – 200 мг/кг, Cu-хелат – 200 мг/кг, Со-хелат – 300 мг/кг, I-хелат – 1000 мкг/кг, Fe-хелат – 1000 мг/кг		
		*0/10		
ЛД для Микс-1		0		
Микс-2, самцы	2	Zn-хелат – 750 мг/кг, Mg-хелат – 2000 мг/кг, Mn-хелат – 300 мг/кг, Cu-хелат – 300 мг/кг, Со-хелат – 400 мг/кг, I-хелат – 1500 мкг/кг, Fe-хелат – 2000 мг/кг		
		*4/10		
Микс-2, самки	2	Zn-хелат – 750 мг/кг, Mg-хелат – 2000 мг/кг, Mn-хелат – 300 мг/кг, Cu-хелат – 300 мг/кг, Со-хелат – 400 мг/кг, I-хелат – 1500 мкг/кг, Fe-хелат – 2000 мг/кг		
		*6/10		
ЛД для Микс-2		50		

Влияние однодневного в/ж введения хелатов на общее состояние и поведенческие реакции мышей

В течение 14-ти дней после введения хелатов осуществлялся ежедневный осмотр животных в клетке содержания, на руках и на открытой площадке, оценивалось их общее состояние. Т.к. поведение животных почти во всех группах

было относительно идентичным, для наглядности мы решили привести описание общего состояния и поведения животных, получавших наивысшие дозы и переживших интоксикацию в первые часы после введения исследуемых веществ. Результаты наблюдений в течение 24 ч после введения хелатов представлены в табл. 4.

Таблица 4

Влияние однократного в/ж введения хелатов на общее состояние и поведенческие реакции мышей в течение 24 ч после введения

№ п/п	Показатель	Контр. гр.	Zn-хелат, 750 мг/кг	Mg-хелат, 2000 мг/кг	Mn-хелат, 300 мг/кг	Cu-хелат, 300 мг/кг	Со-хелат, 400 мг/кг	I-хелат, 1500 мкг/кг	Fe-хелат, 2000 мг/кг	Микс-1	Микс-2
Наблюдения в руках											
<i>Реакция на взятие в руки</i>											
1.	никакой реакции	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	3/2	—	5/6	1/1
	низкая реакция	—	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	7/8	9/9	5/4	6/5
	умеренная реакция	10/10	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	высокая реакция	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
<i>Вокализация</i>											
2.	никакая	10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	после перемещения из клетки	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	в течение взятия в руки	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	в течение перемещения и взятия в руки	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
<i>Пальцевальное закрытие, состояние глазной щели</i>											
3.	веки широко открыты	10	—/—	1/2	4/5	6/5	8/6	10/10	9/9	8/8	—/—
	птоз	—	3/3	4/3	2/2	2/2	2/1	—/—	—/—	2/2	7/6
	веки полностью закрыты	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	Осмотр животных в клетке										
<i>Глаза</i>											
4.	норма	10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	ксерофтальмия	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	слезотечение	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	нагноение	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	воспаление	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	отечность	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
экзофтальм	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	
<i>Зрачковый статус относительно условий освещения комнаты (лаборант наблюдает состояние зрачков)</i>											
5.	норма	—	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	мидриаз	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	миоз	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
<i>Уши</i>											
6.	норма	10/10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6

№ п/п	Показатель	Контр. гр.	Zn-хелат, 750 мг/кг	Mg-хелат, 2000 мг/кг	Mn-хелат, 300 мг/кг	Cu-хелат, 300 мг/кг	Со-хелат, 400 мг/кг	I-хелат, 1500 мкг/кг	Fe-хелат, 2000 мг/кг	Микс-1	Микс-2
6.	покраснение	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	напущение	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	воспаление	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	бледность	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
7.	норма	10/10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	выпадение зубов	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	сломанные зубы	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	изменение цвета зубов	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
8.	норма	10/10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	покраснение	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	умеренные выделения (кровь)	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	обильные выделения	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
9.	норма	10/10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	гиперсаливация	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	ксеростомия	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	норма	10/10	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	7/8	—/—	—/—
10.	незначительное угнетение в течение 2-3-х часов	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	поверхностное	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	периодическое	—	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	—/—	10/10	7/6
	одышка	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
11.	патологические звуки	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	нарушение носового дыхания	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	норма	10/10	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	взъерошенность	—	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	—/—	10/10	7/6
11.	выпадение шерсти	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	утрата блеска	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	неестественный цвет	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	грязная шерсть	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—

№ п/п	Показатель	Контр. гр.	Zn-хелат, 750 мг/кг	Mg-хелат, 2000 мг/кг	Mn-хелат, 300 мг/кг	Cu-хелат, 300 мг/кг	Со-хелат, 400 мг/кг	I-хелат, 1500 мкг/кг	Fe-хелат, 2000 мг/кг	Микс-1	Микс-2
<i>Тонус мускулатуры</i>											
12.	никакой	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	низкий	—	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	умеренный	10/10	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	высокий	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
<i>Конечности</i>											
13.	норма	10/10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	бледность	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	покраснение	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	отечность	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
Наблюдение на открытой площадке											
<i>Двигательная активность</i>											
14.	норма	10/10	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	повышена	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	возбуждение	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	нарушение реакции	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	снижена	—	4/4	3/4	6/7	8/7	4/7	10/8	9/9	9/10	4/5
	утрата позы	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
заторможенность	—	2/2	3/1	—/—	—/—	2/—	—/2	—/—	1/—	3/—	
<i>Осанка, положение</i>											
15.	типичный диапазон положений (просевание, поднимание, ходьба)	10/10	4/1	3/4	6/6	8/7	4/7	10/8	9/9	9/8	4/3
	нетипичный (н-р, низкая осанка, сутулая, обессиленная)	—/—	2/3	3/2	—/1	—/—	2/—	—/2	—/—	1/2	3/2
	норма	10/10	4/3	5/4	3/4	5/6	5/7	9/8	9/9	10/10	2/1
16.	атаксия	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	нарушение координации	—	2/3	1/1	3/3	3/1	1/—	1/2	—/—	—/—	5/5
	подергивания	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	тремор	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	судороги	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
ретропульсия (заторможенная походка)	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	
ходьба на цыпочках	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—

№ п/п	Показатель	Контр. гр.	Zn-хелат, 750 мг/кг	Mg-хелат, 2000 мг/кг	Mn-хелат, 300 мг/кг	Си-хелат, 300 мг/кг	Со-хелат, 400 мг/кг	I-хелат, 1500 мкг/кг	Fe-хелат, 2000 мг/кг	Микс-1	Микс-2
17.	отсутствует	10/10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	присутствует	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
18.	норма	10/10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	истощение	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	неправильное телосложение	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	ожирение	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
Разное											
Кровотечение											
19.	нет	10/10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	умеренное	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	тяжелое	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	источник	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
Выделения											
20.	норма	10/10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	изменение цвета	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	наличие крови	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	Другое	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
21.	нет	10/10	6/6	6/5	6/7	8/7	6/7	10/10	9/9	10/10	7/6
	травма	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	пальпируемые образования	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	покусы	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	смерть	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—
	умерщлено в агонии	—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—	—/—

Приведенные данные наблюдений отражают 24-часовую реакцию животных на введение исследуемых веществ.

Внешний вид и поведение животных экспериментальных групп отличались от таковых в контроле. Также имелись различия в реакции на взятие в руки. Вокализация при взятии в руки и/или перемещении из клетки почти у всех мышей опытных групп присутствовала.

Отечности или гиперемии слизистых глаз не отмечалось. Нос розовый. Уши бледно-розовые, обычной температуры у всех мышей контрольной и экспериментальных групп. Нагноений, воспалений, загрязнений в ушах не обнаружено. Зубы сохранены. Нарушений слюноотделения не наблюдали.

Дыхание у животных контрольной группы было нормальным, а у мышей, получавших исследуемые вещества, во всех тестируемых дозах наблюдали одышку, неравномерный характер дыхания.

Шерсть у всех животных была блестящая, без очагов облысения. Возбуждение и взъерошенность у нескольких животных, по всей видимости, указывает на реакцию на манипуляции.

Тонус мускулатуры был низким практически у всех подопытных животных.

Видимые слизистые оболочки бледной окраски, блестящие.

Половые органы самцов развиты правильно, молочные железы самок без уплотнений на ощупь, выделения из сосков отсутствовали.

Деформации или отека конечностей нет. Кожа без признаков раздражения или воспаления.

Статистическая обработка представленных в таблицах данных проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента для множественных сравнений. В каждом случае данные сравнивались попарно, в

соответствии с дозировкой и сроком исследования.

Клиническая картина интоксикации

При введении среднетоксических и максимальных доз исследуемых веществ картина интоксикации у животных нарастала довольно быстро: через 15-20 мин после введения наблюдались снижение двигательной активности, заторможенность, брадикардия; через 30-40 мин — прострация; через 1-7 ч — отечность глаз, утрата позы, потеря сознания, нарушение частоты дыхательных движений и гибель 10-80% животных, которым вводили хелатные соединения.

После введения *Zn-хелата* у самок и самцов наблюдали схожую картину интоксикации — в дозе 250 мг/кг животные погибали в течение 3-4 ч после введения, при ЛД₂₅. Увеличение дозы в 2 раза вызывало гибель 50% подопытных животных уже через 0,5-1 ч после введения, а в дозе 750 мг/кг гибли 60% животных в течение первого часа. Выжившие животные восстанавливались уже на следующие сутки, и все физиологические параметры приходили в норму.

Mg-хелат имел выраженный токсический эффект во всех исследуемых дозах. В дозе 1000 мг/кг погибали треть животных в опытных группах (самки и самцы). ЛД составила 33%. Увеличение дозы линейно влекло за собой падеж животных: при дозе 1500 мг/мл погибали 50% животных в первые 3 ч после введения, а при дозе 2000 мг/кг — уже 80% животных за первый час наблюдения. Наблюдали гибель одной мыши (самка) через 26 ч после введения вещества в дозе 1500 мг/мл. Все выжившие животные приходили в физиологическую норму через 1-1,5 суток.

После введения *Mn-хелата* наблюдали гибель животных (как самок, так и сам-

цов) в первые 1-3 ч после введения, вне зависимости от дозы препарата. После введения хелата в дозе 100мг/кг гибель составила 15%, в дозе 200 мг/кг — 33%, 300 мг/кг — 60%.

Си-хелат вызывал гибель животных при дозе 100 мг/мл (20%), после введения 200 мг/мл гибли 50% животных в группах. Доза 300 мг/кг вызывала гибель 90% мышей. Картина интоксикации наступала уже через 10-20 мин после введения хелата: наблюдались снижение двигательной активности, заторможенность; через 40-50 мин — прострация; через 1-4 ч — утрата позы, потеря сознания, нарушение частоты дыхательных движений и гибель животных.

Примерно аналогичную картину наблюдали при введении *Со-хелата*. 27% животных погибали при дозе 200 мг/кг, 50% — при дозе 300 мг/кг и 80% — при дозе 400 мг/кг. Интоксикация также совпадала с описываемой для Си-хелата: животные погибали в первые часы после введения препарата.

После введения *I-хелата* во всех трех дозах гибели животных не наблюдали. При дозе 1000 и 1500 мкг/кг в первые 1-8 ч у 80% животных наблюдалось снижение двигательной активности. Визуаль-

ная картина интоксикации полностью исчезала через сутки, все физиологические показатели животных приходили в норму.

Введение *Fe-хелата* сопровождалось частичной гибелью животных. При введении вещества в дозе 1500 мг/кг через 26 ч погиб 1 самец, а при дозе 2000 мг/кг ЛД составила 20%. Животные погибали через 6-18 ч после введения.

Интересную картину наблюдали при введении смеси хелатов *Микс-1*. Животные были угнетены, наблюдалось подергивание конечностей, однако эти изменения в состоянии не носили критичного характера, поэтому не привели к гибели. Все проявления интоксикации исчезали в течение 2-х суток с момента введения веществ. На следующий день все животные, участвовавшие в эксперименте, мало потребляли пищу.

После введения смеси хелатов *Микс-2* в течение 2-6 ч наблюдали гибель 50% животных.

Половых различий в симптомах интоксикации во всех случаях не наблюдалось.

Влияние веществ на массу тела экспериментальных животных представлены в табл. 5.

Таблица 5

Влияние однократного в/ж введения хелатов на массу тела мышей, г ($M \pm m$)

Группа	До начала исследования		15-й день исследования	
	самки	самцы	самки	самцы
Контроль	18,1±0,3	19,7±2,2	21,2±0,4	22,9±2,1
Zn-хелат, доза 250 мг/кг	20,3±0,4	19,8±2,1	21,1±0,3	22,9±2,4
Zn-хелат, доза 500 мг/кг	20,0±0,3	19,0±1,4	20,8±0,5	21,3±1,8
Zn-хелат, доза 750 мг/кг	20,6±0,5	19,1±2,2	21,4±0,6	21,6±2,4
Mg-хелат, доза 100 мг/кг	19,7±0,4	18,4±1,3	20,4±0,5	21,1±1,8
Mg-хелат, доза 1500 мг/кг	18,4±0,6	19,3±1,9	20,9±0,4	20,0±2,2

Mg-хелат, доза 2000 мг/кг	21,3±0,5	21,0±1,9	22,0±0,6	23,1±2,3
Mn-хелат, доза 100 мг/кг	18,5±0,3	19,6±1,5	20,9±0,3	21,5±1,4
Mn-хелат, доза 200 мг/кг	18,3±0,3	21,2±1,1	21,0±0,4	21,1±1,4
Mn-хелат, доза 300 мг/кг	20,8±0,4	18,8±2,1	21,5±0,5	20,9±2,8
Cu-хелат, доза 100 мг/кг	19,6±1,8	18,6±1,8	22,8±2,3	21,9±2,1
Cu-хелат, доза 200 мг/кг	19,9±1,3	21,3±1,7	21,1±2,1	21,3±0,3
Cu-хелат, доза 300 мг/кг	19,8±1,8	20,8±1,2	21,5±1,6	20,1±0,4
Co-хелат, доза 200 мг/кг	20,4±2,0	18,4±2,2	21,2±2,2	20,4±0,3
Co-хелат, доза 300 мг/кг	19,7±1,7	18,0±2,0	19,1±1,8	19,4±0,5
Co-хелат, доза 400 мг/кг	20,5±1,6	18,6±1,3	19,8±2,3	21,1±0,6
I-хелат, доза 500 мкг/кг	20,8±2,5	19,4±1,8	22,9±1,8	21,3±0,4
I-хелат, доза 1000 мкг/кг	21,1±1,8	21,3±0,9	21,4±2,4	20,2±0,3
I-хелат, доза 1500 мкг/кг	21,9±2,2	18,2±1,8	21,2±1,2	20,4±0,3
Fe-хелат, доза 1000 мг/кг	19,9±1,5	18,8±1,0	19,1±1,9	19,9±0,4
Fe-хелат, доза 1500 мг/кг	21,1±2,1	18,6±1,3	20,6±2,1	20,2±0,3
Fe-хелат, доза 2000 мг/кг	19,1±0,2	19,3±0,5	19,6±0,4	20,0±0,4
Микс-1	19,0±0,6	19,4±0,2	20,6±0,3	20,6±0,4
Микс-2	19,3±0,4	19,2±0,3	19,4±0,3	20,1±0,6

Статистически значимых отличий в динамике массы тела подопытных мышей на протяжении всего исследования обнаружено не было, т.е. однодневное в/ж введение экспериментальным животным исследуемых хелатных соединений не оказывает влияния на динамику массы тела.

Результаты гистологического исследования

Гистологическому исследованию подвергались органы животных контрольной группы и животных, которые пали в первые 1-2 сут после начала введения хелатов.

Объекты фиксировали в 10% формалине и заливали в парафин. Головной мозг фиксировали в 96% спирте и заливали в парафин. Срезы внутренних органов окрашивали гематоксилин-эозином.

При просмотре гистологических препаратов изучаемых органов контрольных

животных и животных, получавших хелаты, различия между группами были обнаружены в следующих случаях:

Печень

Контрольная группа: трабекулярное строение на срезах, полученных из объектов разных долей печени, нарушений не представляет. Границы гепатоцитов отчетливые, цитоплазма зернистая, слабо оксифильная. Очаговых нарушений тинкториальных свойств цитоплазмы нет. Ядра содержат четкие ядрышки и достаточное количество хроматина. Ядерная мембрана тонкая. Синусоиды печени полнокровные.

Легкие

Контрольная группа: эпителий гортани, трахеи, крупных бронхов не изменен, ядра четкие. Альвеолы всех долей легких содержат воздух. Ядра альвеолярного

эпителия четкие, цитоплазма оксифильная. Эпителий внутрилегочных бронхов без изменений. Острые воспалительные изменения легочной ткани отсутствовали.

Тимус

Контрольная группа: тимус сохраняет выраженное дольчатое строение. Корковое вещество долек заполнено лимфоцитами/тимоцитами. Мозговое вещество тимуса содержит меньшее количество лимфоцитов, а также светлые эпителиальные клетки, местами образующие концентрические фигуры и тельца Гассала. Строма тимуса умеренно полнокровная.

Головной мозг

У всех животных цитоархитектоника коры больших полушарий головного мозга не нарушена, очагов выпадения нет. Сосуды мозговых оболочек умеренно полнокровные; кортикальные сосуды равномерного диаметра, содержат единичные эритроциты. Признаки острого или хронического заболевания нейронов отсутствуют. Ядра нейронов светлые, ядерная мембрана тонкая, ядрышки четкие. В цитоплазме определяется достаточное количество хроматофильной зернистости Ниссля: пылевидной в цитоплазме нейронов 2-3 слоев и более крупной – в цитоплазме нейронов 5-го слоя коры больших полушарий. Нейроны разных ядерных образований среднего и продолговатого мозга содержат крупные глыбки тигроида. Ядра нервных и глиальных клеток не изменены, ядерная мембрана тонкая, содержание хроматина нормальное, ядрышки четкие.

Сердце

Клетки эндотелия внутренней оболочки аорты с четкими ядрами. Деструкций эластических волокон средней оболочки нет. Поперечная исчерченность миофибрилл во всех отделах сердца отчетливая, ядра кардиомицитов содержат

достаточное количество хроматина, ядерная оболочка тонкая. Очагов нарушений тинкториальных свойств цитоплазмы нет. Избыточного разрастания стромы (кардиофиброза) нет. Сосуды типичного строения, соотношение коллагена и эластина – 2:1.

Почки

Капилляры клубочков и интерстициальной ткани почек крыс полнокровные, цитоплазма эпителия проксимальных канальцев оксифильная, клеточные границы различимы, ядра эпителия нефронов светлые, четкие.

Надпочечники

Сосуды коры и мозгового вещества надпочечников полнокровные. Все зоны коры надпочечников отчетливо выражены, клеточные ядра содержат достаточное количество хроматина. Цитоплазма клеток пучковой зоны вакуолизована за счет содержания большого количества липидов. Клетки мозгового вещества крупные, овальной формы, объединены в гроздь и тяжи.

Селезенка

Лимфоретикулярные элементы лимфатических узлов и селезенки с четкими ядрами, деструкции или атрофии фолликулов нет. В красной пульпе селезенки видны очаги кроветворения с единичными мегакариоцитами.

Желудочно-кишечный тракт

У контрольных животных слизистая оболочка безжелезистой части желудка выстлана многослойным плоским эпителием, клетки которого изменений не представляют. Покровный эпителий слизистой тела желудка образован слизистыми цилиндрическими клетками, дефектов эпителиальной выстилки нет. Главные и обкладочные клетки желез тела желудка не изменены. Дефектов многослойного плоского неороговевающего эпителия

слизистой пищевода нет.

Почти у всех животных опытных групп наблюдаются геморрагические локальные очаги в ЖКТ.

Поджелудочная железа

Дольчатое строение поджелудочной железы сохранено. Клетки островков Лангерганса содержат светлые, четкие ядра, цитоплазма слабо оксифильная. Эпителиальные клетки внешнесекреторной части железы базофильные, ядра, расположенные в средней части, четкие, с достаточным количеством хроматина. Сосуды стромы поджелудочной железы умеренно полнокровные.

Щитовидная железа

Фолликулы щитовидной железы заполнены небольшим количеством оксифильного, слабовакуолизированного коллоида. Эпителий фолликулов обычной высоты, ядра четкие. Сосуды стромы умеренно полнокровные. Строение подчелюстных желез нарушений не представляет. Эпителиальные клетки концевых отделов и выводных протоков с четкими ядрами, деструкции клеток нет.

Яичники и яички

В корковом веществе яичников самок видны фолликулы разной величины и степени созревания. Фолликулярный эпителий не изменен, ядра светлые, четкие, мозговое вещество яичников полнокровное. Клетки семенных канальцев яичек самцов находятся на разных стадиях сперматогенеза. Эпителий семенных канальцев и интерстициальные клетки не изменены. Ядра четкие.

Таким образом, по результатам гистологического исследования однодневное в/ж введение тестируемых хелатов в дозах, в 100-500 раз превышающих терапевтические, мышам обоего пола оказывает выраженное токсическое действие, в основном, на печень.

Данные некропсии

В макроскопическом исследовании экспериментальных животных, переживших интоксикацию и подвергнутых запланированной эвтаназии, при применении тестируемых веществ различий в состоянии внутренних органов по сравнению с контрольной группой не обнаружено.

Шерсть опытных животных имела опрятный вид, была блестящей, без очагов облысения. Животные имели нормальную упитанность.

Признаков раздражения в месте введения вещества у мышей также не отмечалось.

При осмотре *грудной и брюшной полостей* нарушений в расположении внутренних органов также не наблюдалось.

Подчелюстные *лимфатические узлы* имели округлую форму, бледно-розовую окраску и умеренную плотность. *Слюнные железы* округлой формы, бледно-желтого цвета, умеренной плотности.

Щитовидная железа плотно прилегала к гортани, имела обычные размеры и плотность, розовато-красноватый цвет. Тимус имел треугольную форму, беловатый цвет и умеренно плотную консистенцию.

Величина и форма *сердца* изменений не представляли. Мышца сердца была коричневатой, плотной.

Поверхность *легких* имела бледно-розовую окраску, легкие спадались при вскрытии грудной клетки. Ткань на разрезе также имела однородную бледно-розовую окраску. Слизистая оболочка главных бронхов была гладкой, блестящей, бледно-розовой.

Селезенка имела темно-вишневый цвет, гладкую поверхность и плотноватую консистенцию.

Желудок имел обычную форму и размеры, просвет был заполнен плотным пи-

щевым содержимым. Слизистая тела желудка была бледно-розовой, блестящей, складчатой. Слизистая тонкой и толстой кишки была блестящей, гладкой.

Поджелудочная железа была бледно-розовой, дольчатой.

Величина и форма *печени* изменений не представляли. Капсула печени была тонкой, прозрачной. Ткань печени имела коричневатый цвет и умеренно плотную консистенцию.

Величина и форма *почек* не отличались от контроля, капсула легко снималась. Поверхность органа была гладкой, однородной коричневато-серооливковой окраски. На разрезе почек отчетливо различались корковое и мозговое вещество.

лись корковое и мозговое вещество.

Мочевой пузырь пустой или заполнен прозрачной мочой. Слизистая оболочка пузыря гладкая, блестящая, бледно-розовой окраски.

Форма, размеры и плотность *надпочечников, яичников или яичек* не отличались от контроля.

Оболочки *головного мозга* были тонкими, прозрачными. Вещество головного мозга имело умеренную плотность. Расширения желудочков мозга не наблюдалось.

В табл. 6-13 приведены средние массовые коэффициенты внутренних органов мышей.

Таблица 6

Влияние однократного в/ж введения **Zn-хелата** на массовые коэффициенты органов мышей на 15-й день исследования, % от массы тела ($M \pm m$, $n=5$)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Доза Zn-хелата, мг/кг		
		250	500	750
Сердце	0,43±0,03	0,41±0,02	0,41±0,02	0,42±0,01
Легкие с трахеей	0,90±0,03	0,93±0,03	0,94±0,04	0,88±0,03
Тимус	0,222±0,008	0,220±0,009	0,223±0,017	0,220±0,006
Печень	5,07±0,16	5,10±0,17	5,13±0,14	5,03±0,09
Селезенка	0,67±0,01	0,65±0,02	0,62±0,01	0,65±0,03
Почка (левая)	0,83±0,05	0,82±0,03	0,86±0,02	0,81±0,03
Надпочечники	0,042±0,003	0,039±0,004	0,041±0,002	0,043±0,003
Головной мозг	0,83±0,05	0,82±0,01	0,86±0,06	0,89±0,04

Таблица 7

Влияние однократного в/ж введения **Mg-хелата** на массовые коэффициенты органов мышей на 15-й день исследования, % от массы тела ($M \pm m$, $n=5$)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Доза Mg-хелата, мг/кг		
		1000	1500	2000
Сердце	0,43±0,03	0,41±0,03	0,42±0,01	0,40±0,02
Легкие с трахеей	0,90±0,03	0,95±0,04	0,97±0,06	0,92±0,01
Тимус	0,222±0,008	0,222±0,015	0,228±0,017	0,224±0,010
Печень	5,07±0,16	5,17±0,12	5,12±0,11	5,15±0,16
Селезенка	0,67±0,01	0,59±0,02	0,64±0,02	0,63±0,01
Почка (левая)	0,83±0,05	0,87±0,04	0,81±0,02	0,81±0,02
Надпочечники	0,042±0,003	0,039±0,003	0,041±0,004	0,043±0,004
Головной мозг	0,83±0,05	0,79±0,02	0,83±0,06	0,83±0,02

Таблица 8

Влияние однократного в/ж введения **Mn-хелата** на массовые коэффициенты органов мышей на 15-й день исследования, % от массы тела ($M \pm m$, $n=5$)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Доза Mn-хелата, мг/кг		
		100	200	300
Сердце	0,43±0,03	0,429±0,024	0,432±0,028	0,455±0,025
Легкие с трахеей	0,90±0,03	0,949±0,017	0,945±0,027	0,952±0,019
Тимус	0,222±0,008	0,226±0,008	0,224±0,007	0,228±0,006
Печень	5,07±0,16	4,780±0,15	5,913±0,21	5,732±0,22
Селезенка	0,67±0,01	0,602±0,013	0,694±0,021	0,675±0,019
Почка (левая)	0,83±0,05	0,879±0,019	0,884±0,039	0,769±0,032
Надпочечники	0,042±0,003	0,047±0,006	0,049±0,003	0,044±0,005
Головной мозг	0,83±0,05	0,76±0,027	0,73±0,036	0,82±0,048

Таблица 9

Влияние однократного в/ж введения **Cu-хелата** на массовые коэффициенты органов мышей на 15-й день исследования, % от массы тела ($M \pm m$, $n=5$)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Доза Cu-хелата, мг/кг		
		100	200	300
Сердце	0,43±0,03	0,38±0,02	0,39±0,03	0,41±0,01
Легкие с трахеей	0,90±0,03	0,93±0,03	0,89±0,02	0,93±0,06
Тимус	0,222±0,008	0,223±0,011	0,220±0,008	0,224±0,012
Печень	5,07±0,16	5,17±0,12	5,19±0,07	5,21±0,17
Селезенка	0,67±0,01	0,65±0,02	0,62±0,01	0,62±0,01
Почка (левая)	0,83±0,05	0,82±0,03	0,84±0,02	0,84±0,01
Надпочечники	0,042±0,003	0,042±0,001	0,039±0,003	0,041±0,002
Головной мозг	0,83±0,05	0,86±0,02	0,78±0,05	0,79±0,02

Таблица 10

Влияние однократного в/ж введения **So-хелата** на массовые коэффициенты органов мышей на 15-й день исследования, % от массы тела ($M \pm m$, $n=5$)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Доза So-хелата, мг/кг		
		20	300	400
Сердце	0,43±0,03	0,44±0,02	0,40±0,03	0,39±0,03
Легкие с трахеей	0,90±0,03	0,89±0,06	0,94±0,04	0,97±0,02
Тимус	0,222±0,008	0,218±0,008	0,220±0,012	0,223±0,014
Печень	5,07±0,16	5,18±0,10	5,20±0,13	5,12±0,11
Селезенка	0,67±0,01	0,66±0,04	0,61±0,01	0,62±0,04
Почка (левая)	0,83±0,05	0,79±0,04	0,80±0,04	0,80±0,05
Надпочечники	0,042±0,003	0,043±0,003	0,039±0,004	0,039±0,004
Головной мозг	0,83±0,05	0,86±0,02	0,83±0,03	0,79±0,02

Таблица 11

Влияние однократного в/ж введения **I-хелата** на массовые коэффициенты органов мышей на 15-й день исследования, % от массы тела ($M \pm m$, $n=5$)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Доза I-хелата, мкг/кг		
		500	1000	1500
Сердце	0,43±0,03	0,40±0,01	0,40±0,02	0,43±0,02
Легкие с трахеей	0,90±0,03	0,92±0,03	0,95±0,04	0,89±0,04
Тимус	0,222±0,008	0,221±0,009	0,222±0,016	0,224±0,011
Печень	5,07±0,16	5,22±0,12	5,16±0,17	5,21±0,14
Селезенка	0,67±0,01	0,65±0,02	0,59±0,05	0,63±0,06
Почка (левая)	0,83±0,05	0,84±0,04	0,81±0,02	0,84±0,02
Надпочечники	0,042±0,003	0,041±0,003	0,037±0,001	0,041±0,002
Головной мозг	0,83±0,05	0,80±0,04	0,86±0,02	0,83±0,04

Таблица 12

Влияние однократного в/ж введения **Fe-хелата** на массовые коэффициенты органов мышей на 15-й день исследования, % от массы тела ($M \pm m$, $n=5$)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Доза Fe-хелата, мг/кг		
		1000	1500	2000
Сердце	0,43±0,03	0,332±0,023	0,330±0,026	0,342±0,022
Легкие с трахеей	0,90±0,03	0,746±0,024	0,752±0,023	0,754±0,028
Тимус	0,222±0,008	0,124±0,004	0,123±0,006	0,120±0,004
Печень	5,07±0,16	4,72±0,16	4,59±0,17	5,12±0,19
Селезенка	0,67±0,01	0,498±0,023	0,424±0,019	0,392±0,018
Почка (левая)	0,83±0,05	0,509±0,022	0,439±0,028	0,423±0,020
Надпочечники	0,042±0,003	0,031±0,004	0,029±0,005	0,028±0,004
Головной мозг	0,83±0,05	1,82±0,032	1,79±0,037	1,80±0,024

Таблица 13

Влияние однократного в/ж введения смеси хелатов **Микс-1** и **Микс-2** на массовые коэффициенты органов мышей на 15-й день исследования, % от массы тела ($M \pm m$, $n=5$)

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Микс-1	Микс-2
Сердце	0,43±0,03	0,350±0,024	0,358±0,027
Легкие с трахеей	0,90±0,03	0,792±0,023	0,744±0,035
Тимус	0,222±0,008	0,126±0,008	0,124±0,008
Печень	5,07±0,16	4,235±0,21	4,528±0,17
Селезенка	0,67±0,01	0,385±0,022	0,374±0,017
Почка (левая)	0,83±0,05	0,567±0,034	0,572±0,040
Надпочечники	0,042±0,003	0,023±0,007	0,030±0,003
Головной мозг	0,83±0,05	1,77±0,032	1,83±0,033

Статистически значимых отличий в массовых коэффициентах внутренних органов подопытных мышей обнаружено не было. Все показатели находились в пределах физиологической нормы.

Заключение

При исследовании острой токсичности хелатов на аутбредных мышах были выявлены значения ЛД₅₀ тестируемых веществ. Предельная доза введенных хелатов была лимитирована максимально возможным объемом введения для мышей. Дозы веществ, которые вводили мышам, превышали терапевтические в 100-500 раз.

Картина интоксикации почти во всех случаях была выражена. Она нарастала довольно быстро: через 15-20 мин после введения наблюдались снижение двигательной активности, заторможенность, брадикардия; через 30-40 мин – протрация; через 1-7 ч – отечность глаз, утрата позы, потеря сознания, нарушение частоты дыхательных движений и гибель 10-80% животных, которым вводили хелатные соединения.

Оценка динамики массы тела показала, что однодневное внутрижелудочное введение экспериментальным животным тестируемых веществ не оказывает влияния на данный показатель.

Вскрытие животных спустя 14 дней после однократного введения хелатов не показало наличия каких-либо остаточных явлений, связанных с перенесенной интоксикацией.

Нами было установлено, что в группе животных, получавших смесь хелатов Микс-1, смертности не наблюдалось. Это можно объяснить тем, что при избыточных дозах на уровне энтерального обмена возникает конкуренция за всасывание минеральных элементов, в результате чего

они как бы «нейтрализуют» друг друга.

Гибель животных при введении смеси Микс-2, по всей видимости, связана с острым переизбытком металлов, и, как следствие, нарушением стабильности энтеральной среды или блокировкой ферментных систем организма.

Остаточных явлений, связанных с перенесенной интоксикацией, при некропсии животных не обнаружено.

Данные по 21-дневной субхронической токсичности исследуемых хелатов будут опубликованы в следующих работах по этой тематике.

Список литературы

1. *Авцын А.П., Жаворонков Ф.Ф., Риш М.А., Строчкова Л.С.* Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология. — М.: Медицина. 1991. 496 с.
2. *Березовская И.В.* Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Хим.-фармац. журн. 2003. Т. 37. № 3. С. 32-34.
3. *Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М., Шмидт Е.Ф.* Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. — М.: «Наука». 1983. 190 с.
4. *Гацура В.В.* Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. — М., «Медицина». 1974. 143 с.
5. *Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В.* Лабораторные животные. — Киев: Вища школа. 1983. 384 с.
6. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. — М.: Изд-во ВПК. 2007.

7. **Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Станкова Н.В., Ревякин А.О., Матвеев Е.Л., Костокрызова Р.Г., Люблинский С.Л., Колышев И.Ю., Берзин И.А.** Оценка эффективности рецептуры «МيوАктив-Спорт» в модельных условиях высоких физических нагрузок // Биомедицина. 2012. № 4. С. 70-75.
8. **Литвицкий П.Ф.** Патофизиология. Том 2. — М.: Из-во Гэотар-Мед. 2002. 807 с.
9. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (РД 64-126-91). — М.: МЗ России. ФК. 1992. 45 с.
10. **Ревякин А.О., Алимкина О.В., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Киселев А.Г., Казакова Л.Х., Степанова О.И., Касинская Н.В., Деньгина С.Е., Люблинский С.Л., Колышев И.Ю., Берзин И.А.** Влияние рецептуры «МيوАктив-Спорт» на биохимические и гематологические показатели лабораторных крыс // Биомедицина. 2012. № 4. С. 59-66.
11. **Ревякин А.О., Алимкина О.В., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Киселев А.Г., Казакова Л.Х., Степанова О.И., Касинская Н.В., Деньгина С.Е., Люблинский С.Л., Колышев И.Ю., Берзин И.А.** Исследование гормонального статуса лабораторных крыс при употреблении рецептуры «МيوАктив-Спорт» // Биомедицина. 2012. № 4. С. 67-70.
12. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. — М.: Профиль-2С. 2010.
13. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. 212 с.
14. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. — 2 изд., перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство «Медицина». 2005. 832 с.
15. **Сидоров К.К.** Методы определения острой токсичности и опасности химических веществ // Токсикология. — М.: Медицина. 1970. 171 с.
16. **Скальный В.Л., Рудаков И.А.** Биоэлементы в медицине. — М.: Изд. дом «Оникс 21 век»: Мир. 2004. 272 с.
17. **Урбах В.Ю.** Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях (монография). — М.: Медицина. 1975. 296 с.
18. Человек. Медико-биологические данные. Публ. 23. МКРЗ. — М.: Медицина. 1977. 496 с.
19. **Эмсли Дж.** Элементы (пер. с англ.). — М.: Мир. 1993. 256 с.
20. **Bertram H.P.** Spurrenelemente. Analytik, okotoxikologische und medizinisch-klinische bedeutung.-Munchen, Wein, Baltimore: Urban und Schwarzenberg. 1992. 207 p.
21. **Furst A.** Chemistry of chelation in cancer / Springfield: C.C. Thomas. 1963.
22. Guide for the care and use of laboratory animals. — National Academy press. — Washington, D.C. 1996.
23. Haaranalyse in medizin und umwelt / Herausb. von C. Krause und M. Chutsch., — Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag. 1987. 223 s.
24. **Morgan G.T., Drew H.D.K.** Researches on residual affinity and coordination: II. Acetylacetonates of selenium and

tellurium // J. chem. soc. 1920. 117/118
(697). P. 1456-1465.

25. *Pais I., Jonts J.B.* The handbook of elements. Boca Raton: St. Lucie Press. 2000. 223 p.

Role of microcells in the sports nutrition and safety of metalchelates

N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko, S.L. Lyublinskiy, G.D. Kapanadze, A.O. Revyakin, L.A. Bolotskikh, N.V. Kasinskaya, N.V. Stankova

Chelated zinc, magnesium, manganese, iron, cobalt, iodine, and mixtures thereof in various doses were investigated in the acute toxicity experiment. These compounds may be used as components for sports nutrition product "MioActive-Sport". Toxicity effect was showed as individual chelating compounds and mixtures thereof in the laboratory experiment outbred mice at doses many times exceeding the therapeutic. Found that the 100-500-fold excess of a therapeutic dose of chelates exhibit some toxic effects observed at this competition clearly vital micronutrient absorption by the gastrointestinal tract.

Key words: MioActive-Sport, chelates, mice, acute toxicity.



Влияние метопролола и бисопролола на течение экспериментальной бронхиальной астмы

П.А. Ворончихин¹, М.А. Сырцова¹, С.В. Талантов², И.Л. Ерохина³,
Д.Э. Коржевский⁴, Е.Г. Сухорукова⁴, С.В. Оковитый¹, А.В. Куликов²

¹ — ГБОУ ВПО СПХФА, Санкт-Петербург

² — ФГК ВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. Кирова», Санкт-Петербург

³ — ФГБУ науки «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

⁴ — ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Контактная информация: Павел Алексеевич Ворончихин, pavalexvor@mail.ru

В работе представлены результаты влияния β -адреноблокаторов в монотерапии или в комбинации с базисной противовоспалительной терапией на течение экспериментальной бронхиальной астмы у крыс. Изучены морфологические изменения в легких, выявлено снижение количеств β -адренорецепторов в легких под действием базисной противовоспалительной терапии бронхиальной астмы. Было обнаружено, что селективные β -адреноблокаторы у животных с экспериментальной бронхиальной астмой при ингаляционном или пероральном введении не увеличивают выраженность воспалительных изменений в бронхо-легочном древе. На фоне стандартной терапии бронхиальной астмы при дополнительном использовании β -адреноблокаторов плотность β -адренорецепторов не только не уменьшается, но и имеет тенденцию к повышению. Представляется перспективным дальнейшее изучение возможности использования, эффективности и безопасности комбинированного применения β -адреноблокаторов со средствами базисной терапии бронхиальной астмы как у больных с бронхиальной астмой, так и у пациентов с сочетанной кардио-пульмонарной патологией.

Ключевые слова: экспериментальная бронхиальная астма, крысы, β -адреноблокаторы, метопролол, бисопролол.

Введение

Бронхиальная астма (БА) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) являются наиболее распространенными заболеваниями дыхательных путей, сопровождающимися обратимой или необратимой бронхообструкцией. По данным *Global initiative for Asthma* (GINA, 2011), количество больных БА в мире составляет 300 млн чел., при этом

количество ежегодно регистрируемых смертельных исходов составляет примерно 250000 чел., причем основная часть пациентов — дети [19].

β 2-Адреномиметики (β 2-АМ) широко используют как в качестве эффективных средств купирования приступов бронхоспазма, так и в комбинации с ингаляционными глюкокортикоидами (ИГК) при проведении базисной терапии БА [5].

Наряду с бронхолитическим действием, эта группа препаратов повышает мукоцилиарный клиренс в дыхательных путях, снижает проницаемость эндотелия сосудов и уменьшает скорость высвобождения гистамина из тучных клеток [4, 6]. Однако частое применение короткодействующих β_2 -АМ или длительная комбинированная терапия с применением β_2 -АМ длительного действия может приводить к снижению ее эффективности вследствие развития десенситизации β -адренорецепторов (β -АР) [4, 5, 6, 22]. С этим процессом также связывают появление гиперреактивности дыхательных путей, что увеличивает вероятность обострения заболевания у пациентов [9, 14, 21]. Для предотвращения или преодоления десенситизации β -АР в практике зачастую повышают дозы ИГК, что увеличивает риск развития системных побочных эффектов. Кроме того, необходимо отметить, что у 5-15% пациентов применение ИГК не оказывает должного эффекта в результате генетической мутации рецепторов, их десенситизации и повышения активности внутриклеточных ферментов.

Интересным подходом к предотвращению десенситизации β -АР является ингаляционное применение низких доз антагонистов β -АР при проведении базисной терапии БА. Предполагается, что их введение в терапию может уменьшать воздействие на рецепторы повышенной концентрации β_2 -агонистов и продуктов их метаболизма, что может позволить лучше контролировать течение заболевания.

В настоящее время опубликовано несколько работ, посвященных этому вопросу. На модели экспериментальной БА установлено, что введение β -АБ в течение 30 дней увеличивает ОФВ₁, снижает

уровни цитокинов, IgE, количество эозинофилов в бронхо-легочном смыве, а также активность бокаловидных клеток [7, 12, 15, 16]. Однако пока не получено данных о влиянии длительного применения β -АБ на плотность β -АР в дыхательных путях, выраженность инфильтрации стенки бронхов эозинофилами, количество тучных клеток и выраженность воспалительных изменений в легких.

Целью настоящей работы стало установление влияния селективных β_1 -АБ (метопролол, бисопролол) при различных путях введения на течение БА у крыс с использованием модифицированной овальбуминовой модели БА.

Материалы и методы

Эксперимент проводился в течение 60 дней на аутбредных крысах-самцах ($n=35$) массой 260-290 г, полученных из питомника РАМН «Рапполово». Содержание животных осуществлялось в условиях вивария СПХФА, на стандартном рационе при свободном доступе к воде, 12-час световом режиме, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (прил. к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены этическим комитетом.

Для моделирования бронхиальной астмы у крыс использовалась овальбуминовая модель [10, 18], модифицированная путем замены адъюванта (убитая культура *Bordetella pertussis*) на препарат «Бронхо-Мунал» [1]. Схема эксперимента представлена в табл. 1.

Первые 30 дней у животных моделировали БА с помощью подкожных инъекций овальбумина (*Grade V, Sigma*, США) в дозе 1 мг/кг, который предварительно адсорбировали на геле алюминия гидрок-

Схема проведения эксперимента

Группа	1-й, 7-й дни	15-60 дни	31-60 дни	
			β-АБ	Базисная терапия (ингаляции сальбутамола и будесонида)
К	—	—	Эквивалентное количество физиологического раствора	
1	ОВА+БМ	ОВА	—	—
2	ОВА+БМ	ОВА	Бисопролол	—
3	ОВА+БМ	ОВА	Метопролол	—
4	ОВА+БМ	ОВА	—	+
5	ОВА+БМ	ОВА	Бисопролол	+
6	ОВА+БМ	ОВА	Метопролол	+

Примечание: ОВА – овальбумин, БМ – препарат «Бронхо-мунал».

сида (*Sigma*, США) 1:100, и внутрибрюшинных инъекций препарата «Бронхо-Мунал» (БМ) в дозе 2,5 мг/кг на 1-й и 7-й дни. Контрольным животным вводилось эквивалентное количество физ. раствора. Начиная с 15-го дня, в последующие 45 дней каждые 3 дня проводили ингаляции 5% раствором овальбумина в течение 15 мин с помощью небулайзера «F1000» (*Flaet*, Италия), со скоростью потока 0,25 мл/мин. На 31-й день опытных животных разделили на 6 групп, по 5 в каждой. Группу 1 составили животные с моделированной БА, которые вместо базисной терапии получали физ. раствор. Группам 2 и 5 перорально вводился бисопролол (5 мг/кг), группам 3 и 6 ингаляционно вводился метопролол (1 мг/мл). Группам 4, 5 и 6 проводили стандартное лечение ингаляционным глюкокортикоидом будесонидом 2 мл 0,05% раствора (Пульмикорт, *Astra-Zeneca*, Швеция) и β-адреносиметиком сальбутамолом 2,5 мл 0,1% раствора (Сальгим, ЗАО Пульмомед, Россия) (табл. 1). Селективные β-АБ были выбраны ввиду их низкого бронхоконстрикторного потенциала. На

60-й день производили взятие материала (кровь, ткань легких) с его последующей фиксацией, согласно рекомендациям [2].

Исследование периферической крови проводили на гематологическом анализаторе «*Abacus Junior Vet*» (*Diatron*, Австрия).

Морфологическое исследование легких включало подсчет эозинофилов, тучных клеток, определения объема муцина в просвете бронхов. Для обнаружения тучных клеток использовали толуидиновый синий. Краситель наносили на предварительно депарафинированные срезы и оставляли на 3-5 мин. Тучные клетки при этом окрашивались в темно-синий цвет. Анализ проводили по 5-ти областям при объективе х40 в перибронхиальной, периваскулярной и лимфоидной ткани.

Эозинофилы выявляли водным 0,1% раствором эозина в течение 3-5 мин, который окрашивает эти клетки в малиновый цвет. Анализ проводили по 5-ти областям при объективе х100.

Оценку активности бокаловидных клеток осуществляли, определяя объем муцина в просвете бронхов. Муцин вы-

являли с помощью альцианового синего, окрашивающего кислые гликопротеиды в ярко-синий цвет. Подсчет клеток и площади занимаемой слизи в бронхах (в %) вели с помощью программы *ImageJ 1.41o* (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

Плотность β -АР после моделирования БА и последующей фармакотерапии оценивали на 56-й день эксперимента с помощью сцинтиграфии с использованием мета-[123]-бензилгуанидина (МИБГ). По химическому строению он сходен с адреналином и норадреналином, конкурируя с ними за связывание с рецепторами. В нашем эксперименте мы исследовали состояние симпатической нервной системы легких крыс. Препарат вводили в объеме 0,2 мл в хвостовую вену животного. Оценку накопления проводили через 20 мин и 2 ч после инъекции или до накопления 300000 импульсов. Наибольшее накопление препарата было зафиксировано в щитовидной железе, легких, сердце, печени, селезенке и мочевом пузыре.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы *Biostat*

4.03 с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Результаты исследований

Анализ периферической крови у животных с моделированной БА показал, что развитие патологического процесса сопровождается выраженным лейкоцитозом, лимфоцитозом, эозино- и нейтрофилией (табл. 2). Введение крысам с БА бисопролола перорально вызывало снижение количества эозинофилов и увеличение числа нейтрофилов в крови, при этом количество лимфоцитов не уменьшалось по сравнению с БА. Ингаляции метопролола животным с патологией вызывали снижение количества всех типов лейкоцитов в крови. Проведение базисной терапии (БТ), введение бисопролола, комбинация БТ и бисопролола не уменьшали количества лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов. Введение же ингаляционной формы метопролола достоверно уменьшало количество лейкоцитов и лимфоцитов. Количество эозинофилов было минимальным в группах, получавших β -адреноблокаторы.

Таблица 2

Некоторые показатели периферической крови экспериментальных животных

Группа	Лейкоциты, $10^9/л$	Лимфоциты, $10^9/л$	Эозинофилы, $10^9/л$	Нейтрофилы, $10^9/л$
К	6,7 \pm 0,2	4,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,03	2,2 \pm 0,17
1	14,9 \pm 2,3*	9,5 \pm 0,3*	2,0 \pm 0,05*	3,4 \pm 0,11*
2	17,0 \pm 0,8*	11,1 \pm 0,35**	1,4 \pm 0,1*	5,1 \pm 0,6**
3	16,2 \pm 0,25*	11,9 \pm 0,7**	0,2 \pm 0,07#	4,1 \pm 0,17**
4	9,1 \pm 0,6**	6 \pm 0,3**	0,25 \pm 0,05#	2,9 \pm 0,15**
5	17,3 \pm 1,9*	9,5 \pm 0,3**	0,5 \pm 0,03**	7,3 \pm 0,4**
6	11,4 \pm 0,6**	6,2 \pm 0,5**	0,25 \pm 0,06#	5,0 \pm 0,3**

Примечание: указаны средние значения \pm SEM.

К — контрольная (позитивная) группа; 1 — группа с БА (негативный контроль); 2 — группа с БА, подвергнутая терапии будесонидом и сальбутамолом; 3 — группа с БА, терапия бисопрололом; 4 — группа с БА, терапия метопрололом; 5 — группа с БА, лечение аналогичное группе 2 в сочетании с бисопрололом; 6 — группа с БА, лечение аналогичное группе 2 в сочетании с метопрололом.

* — $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений контрольной группы;

— $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений группы с моделированной БА.

Морфологическое исследование тканей легкого показало, что при экспериментальной БА увеличивается количество тучных клеток во всех изучаемых областях. Под воздействием фармакотерапии количество тучных клеток резко уменьшалось (табл. 3). В крупных бронхах, подслизистой лимфоидной ткани и периваскулярном пространстве стати-

стически значимое снижение количества клеток наблюдалось в группах, получавших стандартное лечение и комбинацию с β -АБ, причем при использовании β -АБ в ингаляционной форме оно было наиболее выражено. В малых бронхах наименьшее количество тучных клеток обнаружено в группах, получавших комбинированную терапию с β -АБ.

Таблица 3

Количество тучных клеток в некоторых областях легких

Группа	Крупные бронхи	Мелкие бронхи	Лимфоидная ткань	Периваскулярное пространство
К	4,80±0,4	2,30±0,2	3,00±0,2	3,00±0,6
1	8,00±1,0*	3,70±0,3*	5,50±0,3*	7,60±1,5*
2	1,90±0,2**	2,50±0,2*	2,20±0,3**	3,80±0,5#
3	3,90±0,6#	3,30±0,2*	4,30±0,5**	1,80±0,3**
4	2,30±0,5**	2,90±0,1**	2,00±0,3**	1,30±0,2**
5	1,30±0,2**	1,80±0,2*	1,40±0,3**	1,90±0,2**
6	0,30±0,1**	1,80±0,1**	1,40±0,4**	1,50±0,3**

Примечание: указаны средние значения ± SEM.

К — контрольная (позитивная) группа; 1 — группа с БА (негативный контроль); 2 — группа с БА, подвергнутая терапии будесонидом и сальбутамолом; 3 — группа с БА, терапия бисопрололом; 4 — группа с БА, терапия метопрололом; 5 — группа с БА, лечение аналогичное группе 2 в сочетании с бисопрололом; 6 — группа с БА, лечение аналогичное группе 2 в сочетании с метопрололом.

* — $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений контрольной группы;

— $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений группы с моделированной БА.

При моделировании БА количество эозинофилов в тканях легких значительно повышалось (табл. 4), что отражает развитие аллергического воспаления в органе. Под действием всех вариантов терапии происходило резкое снижение

инфильтрации тканей эозинофилами во всех областях, однако не было найдено достоверных отличий между 2-6 группами по числу эозинофилов, инфильтрирующих перибронхиальное пространство.

Количество эозинофилов в некоторых областях легких

Группа	Перибронхиальное пространство	Лимфоидная ткань	Периваскулярное пространство
К	2,5±0,5	0,6±0,2	0
1	41±3,0*	34±1,4*	63,5±0,9*
2	11,5±1,0*#	7±1,1*#	9,5±0,3*#
3	10,0±1,0*#	13,2±1,4*#	14,1±1,8*#
4	10±0,3*#	0,5±0,2#	13,0±0,7*#
5	11,0±1,5*#	9,2±1,0*#	8,1±0,5*#
6	10±1,5*#	9,6±0,7*#	7,2±0,6*#

Примечание: указаны средние значения ± SEM.

К — контрольная (позитивная) группа; 1 — группа с БА (негативный контроль); 2 — группа с БА, подвергнутая терапии будесонидом и салбутамолом; 3 — группа с БА, терапия бисопрололом; 4 — группа с БА, терапия метопрололом; 5 — группа с БА, лечение аналогичное группе 2 в сочетании с бисопрололом; 6 — группа с БА, лечение аналогичное группе 2 в сочетании с метопрололом.

* — $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений контрольной группы;

— $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений группы с моделированной БА.

Оценка муцин-продуцирующей активности бокаловидных клеток показала, что при моделировании БА возрастает количество слизи в просвете бронхов. Под воздействием БТ происходило достоверное снижение ее секреции (табл.

5), а при использовании β -АБ максимальное уменьшение секреции наблюдалось в группах с ингаляционным введением метопролола как в режиме монотерапии, так и при комбинировании с БТ.

Таблица 5

Содержание муцина в просвете бронхов

Группа	Продукция слизи, % от площади поверхности перибронхиального пространства
К	1,0±0,5
1	79,0±6,0*
2	68,0±3,0*
3	38,0±3,0*#
4	12,8±1,5*#
5	20,0±2,0*#
6	1,4±0,5#

Примечание: указаны средние значения ± SEM.

К — контрольная (позитивная) группа; 1 — группа с БА (негативный контроль); 2 — группа с БА, подвергнутая терапии будесонидом и салбутамолом; 3 — группа с БА, терапия бисопрололом; 4 — группа с БА, терапия метопрололом; 5 — группа с БА, лечение аналогичное группе 2 в сочетании с бисопрололом; 6 — группа с БА, лечение аналогичное группе 2 в сочетании с метопрололом.

* — $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений контрольной группы;

— $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений группы с моделированной БА.

Сцинтиграфическое исследование плотности β -адренорецепторов показало, что при моделировании БА происходит снижение плотности β -АР рецепторов, которое не предотвращается использованием препаратов БТ (табл. 6). Под воздействием β -АБ в монотерапии количество регистрируемых импульсов было заметно снижено по сравнению с

животными, получавшими только препараты БТ, что обусловлено оккупацией рецепторов β -АБ, в результате которой радиофармацевтический препарат не может связываться с рецепторами. При добавлении же биспролола или метопролола к базисной терапии количество рецепторов возрастало до контрольных значений.

Таблица 6

Результаты исследования количества β -АР в легких

Группа	Количество импульсов
К	1445,0±129,0
1	1070,0±50,0*
2	973,7±145,5*
3	686,0±6,0**
4	732,5±139,5**
5	1656,0±241,4#
6	1668,0±239,0#

Примечание: указаны средние значения \pm SEM.

К — контрольная (позитивная) группа; 1 — группа с БА (негативный контроль); 2 — группа с БА, подвергнутая терапии будесонидом и сальбутамолом; 3 — группа с БА, терапия биспрололом; 4 — группа с БА, терапия метопрололом; 5 — группа с БА, лечение аналогичное группе 2 в сочетании с биспрололом; 6 — группа с БА, лечение аналогичное группе 2 в сочетании с метопрололом.

* — $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений контрольной группы;

— $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений группы с моделированной БА.

Обсуждение результатов

Для неселективных β -адреноблокаторов (β -АБ) способность вызвать бронхоспазм традиционно считается одним из противопоказаний для применения этих препаратов у лиц с сочетанной патологией сердечно-сосудистой и дыхательной систем [8, 25]. Селективные β -АБ могут быть использованы у пациентов с сочетанной бронхо-легочной патологией при условии надлежащего врачебного наблюдения. Так, биспролол и метопролол селективно блокируют β_1 -адренорецепторы, причем селективность в отношении β_1/β_2 -АР у биспролола выше (1:75), чем у метопролола (1:20) [3, 17]. Однако вопрос безопасности приме-

нения β -АБ у пациентов с БА нуждается в дальнейшем экспериментальном и клиническом изучении.

В нашем исследовании формирование экспериментальной БА у животных сопровождалось выраженным лейкоцитозом и эозинофилией в периферической крови, повышением количества эозинофилов в бронхах, в периваскулярном пространстве и лимфоидной ткани, гиперплазией тучных клеток во всех областях, а также повышение продукции слизи в малых бронхах. Сходные экспериментальные данные были получены другими исследователями при моделировании БА с помощью овальбумина в отношении повышенного количества эозинофилов в

бронхо-легочном смыве и гиперпродукции слизи [10, 13, 23, 24]. Кроме того, при овальбуминовой БА с помощью скинтиграфии с 3-[I¹²⁵]-цианпиндололом и иммунофлуоресцентным исследованием тканей наблюдали снижение плотности β -АР в тканях легкого [7, 12].

Работами *Nguyen L.P.* и соавт. установлено, что введение селективного β 2-АБ 3-изопропиламино-1-7-метил-4-инданил-оксибутан-2-ола (ICI) или/и неселективного надолола животным с экспериментальной БА приводит к снижению количества клеток воспаления в бронхо-легочном смыве, подавлению производства муцина бокаловидными клетками, падению количества тучных клеток в тканях легкого, без сопутствующего увеличения количества β -АР. Кроме того, надолол снижал уровень интерлейкинов (ИЛ-13, ИЛ-10, ИЛ-5) [16, 19]. В другой работе, у животных с БА карведилол и надолол не увеличивали количество клеток воспаления в просвете бронхов, но, в то же время, повышали количество β -АР по сравнению с животными с БА и с животными, получавшими салбутамол [12].

Согласно полученным нами результатам, при монотерапии БА как метопрололом, так и биспрололом уменьшается выраженность воспаления в дыхательных путях, снижается их клеточная инфильтрация, однако увеличения плотности β -АР рецепторов не происходит, что, возможно, обусловлено конкуренцией между МИБГ и β -АБ, остающимся в исследуемых тканях [11, 20].

Первые исследования по совместному применению β -АБ (надолол) и глюкокортикоидного препарата (дексаметазон) показали, что надолол обладает аддитивным эффектом по отношению к дексаметазону, уменьшая при экспериментальной БА инфильтрацию бронхов эозинофилами,

снижая уровни цитокинов и продукцию муцина. При этом было показано, что эффект комбинации средних доз глюкокортикоида и БАБ равен эффекту высоких доз той же комбинации [16].

В нашем исследовании комбинация стандартной терапии БА с β -АБ, действительно, дала больший противовоспалительный эффект, чем стандартное лечение или монотерапия биспрололом или метопрололом. При этом наблюдалось повышение плотности β -АР, в отличие от групп с терапией только антагонистами рецепторов или базисной терапии БА. Очевидно, этот эффект обусловлен снижением времени оккупации β -АР симпатомиметиком и неактивными продуктами его метаболизма за счет постоянного конкурентного взаимодействия с β -АБ. Эффект не зависел от пути введения β -АБ, что позволяет рассматривать ингаляционный путь введения таких препаратов как предпочтительный, минимизирующий возможные риски системного введения препарата.

Выводы

На основании полученных результатов можно заключить, что селективные β -АБ у животных с экспериментальной БА при ингаляционном или пероральном введении не увеличивают выраженность воспалительных изменений в бронхо-легочном дереве. На фоне стандартной терапии БА, при дополнительном использовании β -АБ, плотность β -АР не только не уменьшается, но и имеет тенденцию к повышению. Таким образом, представляется перспективным дальнейшее изучение возможности применения, эффективности и безопасности комбинированного применения β -АБ со средствами базисной терапии БА — как у больных с БА, так и у пациентов с сочетанной кардиопульмонарной патологией.

Список литературы

1. **Ворончихин П.А.** Модифицированная модель бронхиальной астмы у аутбредных крыс / Сб. науч. тр. по материалам II всероссийской науч. конф. «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» // Медицинский академический журнал. 2012. Приложение. С. 114-116.
2. **Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Отеллин В.А.** Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях // Морфология. 2006. Т. 129. № 1. С. 85-86.
3. Рабочая группа Европейского общества кардиологов по бета-блокаторам. Документ о соглашении экспертов по блокаторам β -адренергических рецепторов // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2005. № 1. С. 99-124.
4. **Barnes P.J.** Beta-adrenoceptors on smooth muscle, nerves and inflammatory cells // Life Sci. 1993. Vol. 52. № 26. P. 2101-2109.
5. **Barnes P.J.** Scientific rationale for combination inhalers with a long-acting β 2-agonists and corticosteroids // Eur. Respir. J. 2002. Vol. 19. P. 182-191.
6. **Broadley K.J.** Beta-adrenoreceptor responses of the airways: for better or worse // Eur. J. Pharmacol. 2006. Vol. 533. № 13. P. 15-27.
7. **Callaerts-Vegh Z., Evans K.L.J., Dudekula N., et al.** Effects of acute and chronic administration of β -adrenoreceptors ligands on airway function in a murine model of asthma // PNAS. 2004. Vol. 101. № 14. P. 4949-4953.
8. **Dunn T.L., Gerber M.J., Shen A.S., et al.** The effect of topical ophthalmic instillation of timolol and betaxolol on lung function in asthmatic subjects // Am. Rev. Respir. Dis. 1986. Vol. 133. № 2. P. 264-268.
9. **Haney S., Hancox R.J.** Tolerance to bronchodilation during treatment with long-acting beta-agonists, a randomised controlled trial // Respir. Res. 2005. Vol. 6. P. 107.
10. **Kamachi A., M. Munakata, Y. Nishimura, et al.** Enhance of goblet cell hyperplasia and airway hyperresponsiveness by salbutamol in a rat model of atopic asthma // Thorax. 2001. Vol. 56. P. 19-24.
11. **Khafagi F.A., Shapiro B., Fig L.M., et al.** Labetalol reduces iodine-131-MIBG uptake by pheochromocytoma and normal tissues // J. Nucl. Med. 1989. Vol. 30. P. 481-489.
12. **Lin R., Peng H., Nguyen L.P., et al.** Changes in β 2-adrenoreceptor and other signaling proteins produced by chronic administration of « β -blockers» in a murine asthma model // Pulmonary Pharmacology and therapeutics. 2008. Vol. 21. P. 115-127.
13. **Masuda T., Tanaka H., Komai M., et al.** Mast cells play a partial role in allergen-induced subepithelial fibrosis in a murine model of allergic asthma // Clin. Exp. Allergy. 2003. Vol. 33. № 5. P. 705-713.
14. **Nelson H.S., Weiss S.T., Bleecker E.R., et al.** The salmeterol Multicenter Asthma Research Trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol // Chest. 2006. Vol. 129. № 1. P. 15-26.
15. **Nguyen L.P., Omoluabi O., Parra S.** Chronic exposure to beta-blockers attenuates inflammation and mucin content in a murine asthma model // Am. J. Respir. Cell and Mol. Biol. 2008. Vol. 65. P. 256-261.

16. *Nguyen L.P., Singh B., Okulate A.A., et al.* Complementary anti-inflammatory effects of a β -blocker and a corticosteroid in an asthma model // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2012. Vol. 2. № 385. P. 203-210.
17. *Reiter M.J.* Cardiovascular drug class specificity: β -blockers // *Progress in Cardiovas. Dis.* 2004. Vol. 47. № 1. P. 11-33.
18. *Salmon M., Walsh D.A., Koto H.* Repeated allergen exposure of sensitized Brown — Norway rats induces airway cell DNA synthesis and remodeling // *Eur. Respir. J.* 1999. Vol. 14. P. 633-641.
19. *Singh B.N., Whitlock R.M., Comber R.H., et al.* Effects of cardioselective beta adrenoreceptor blockade on specific airways resistance in normal subjects and in patients with bronchial asthma // *Clin. Pharmacol. Ther.* 1976. Vol. 19. P. 493-501.
20. *Solanki K.K., Bomanji J., Moyes J., et al.* A pharmacological guide to medicines which interfere with the biodistribution of radiolabelled meta-iodobenzylguanidine (MIBG) // *Nucl. Med. Commun.* 1992. V. 13. P. 513-521.
21. *Spitzer W.O., Suissa S., Ernst P., Horwitz R.I., Habbick B., et al.* The use of beta-agonists and the risk of death and near death from asthma // *The new England Journal of medicine.* — 1992. Vol. 326. № 8. P. 501-506.
22. *Taylor D.R., Town G.I., Herbison G.P., et al.* Asthma control during long-term treatment with regular inhaled salbutamol and salmeterol // *Thorax.* 1998. Vol. 53. № 9. P. 744-752.
23. *Tohda Y., Muraki M., Kubo H., et al.* Role of chemical mediators in airway hyperresponsiveness in an asthmatic model // *Respiration.* 2001. V. 68. № 1. P. 73-77.
24. *Tsuchiya T., Nishimura Y., Nishiura T., et al.* Airway remodeling of murine chronic antigen exposure model // *J. Asthma.* 2003. Vol. 40. № 8. P. 935-944.
25. *Vos T., Flaxman A.D., Naghavi M., Lozano R., et al.* Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 disease and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 // *Lancet.* 2012. Vol. 380. P. 9859.

Effect of metoprolol and bisoprolol on the course of experimental bronchial asthma

P.A. Voronchikhin, M.A. Syrtcova, S.V. Talantov, I.L. Erokhina,
D.E. Korzhevskiy, E.G. Sukhorukova, S.V. Okovitiy, A.V. Kulikov

In this article were shown the results of mono- and combination therapy with antiinflammatory β -blockers in rats with experimental bronchial asthma. It is observed, morphological changes in the lungs, revealed changes in the density of β -adrenergic receptors by the action of basis antiinflammatory therapy. It was found that the selective β -blockers in animals with experimental asthma, inhalation or oral administration does not increase the severity of inflammatory change equations in the broncho-pulmonary tree. On top of basis therapy of bronchial asthma, with the additional use of β -adrenoblockers density of β -adrenergic receptors does not decrease, but also has a tendency to increase. Thus, it seems perspective to further researching the possibility of application, efficacy and safety of combined use of β -adrenoblockers with basic treatment of asthma, in patients with asthma and in patients with combined cardio-pulmonary pathology.

Key words: experimental bronchial asthma, rats, β -adrenoblockers, metoprolol, bisoprolol.

Искусственно вызванная патология гепатопанкреаса речных раков

Н.Ю. Корягина¹, Г.И. Пронина², А.О. Ревякин², О.И. Степанова²,
О.В. Баранова², Г.Д. Капанадзе², И.Ю. Меньшиков¹

¹ – Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства РАСХН

² – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Инъекция аллоксана в дозе 100 мг/кг в вентральный синус речных раков приводит к нарушению структуры R-клеток гепатопанкреаса. Отмечается увеличение содержания глюкозы в гемолимфе.

Ключевые слова: моделирование патологии, речные раки, гепатопанкреас, аллоксан (C₄H₂N₂O₄).

Типичные представители беспозвоночных десятиногих – речные раки являются перспективными объектами биомоделирования, обладая сопоставимостью физиологической реакции с высшими животными, а также специфическими свойствами, позволяющими расширить представления о спектре действия тестируемого фактора на биосистему. Они удовлетворяют современным этическим представлениям и нормам, ограничивающим область применения высших животных в экспериментальных исследованиях.

Задачей данного исследования являлось моделирование патологии гепатопанкреаса речных раков как подготовка для трансплантации стволовых клеток с целью их получения путем пассажа через организм рака.

Гепатопанкреас десятиногих ракообразных представляет собой двухлопастной орган, состоящий из множества мелких разветвленных слепых трубочек. Они окружены рыхлой соединительной тканью и содержат железистые клетки. Эпителий гепатопанкреатической тру-

бочки содержит 4 типа клеток (гепатопанкреацитов). Трубочки собираются в пару общих протоков, впадающих в среднюю кишку. Слепой конец каждой трубочки составлен недифференцированными эмбриональными клетками (Е-клетки), которые являются предшественниками всех остальных типов клеток гепатопанкреатической трубочки. Проксимально Е-клеткам располагаются накопительные R-клетки, вакуолизированные В-клетки и фибриллярные F-клетки [7, 8]. При патологии гепатопанкреаса краба-стригуна *Chionoecetes opilio*, вызванной разного рода естественными инфекциями и инвазиями (хитиноподобными бактериями, простейшими *Hematodinium*, паразитическим грибом *Trichomarix invadens*), происходит вакуолизация цитоплазмы R-клеток, уменьшение количества В-клеток, инфильтрация гемоцитами интертубулярной соединительной ткани [4, 5].

У ракообразных (крабов, раков и креветок) гепатопанкреас является органом, совмещающим функции печени и под-

желудочной железы. Из-за особенностей питания отряда *Decapoda* гепатопанкреас секретирует большое количество пищеварительных ферментов, гидролизующих все классы природных полимеров и обладающих широкой специфичностью и необычно высокой активностью [1]. В частности, в организме ракообразных, как и у высших животных и человека, расщепление гликогена в тканях происходит, в основном, под действием ферментов, специфически гидролизующих 1,4- и 1,6-гликозидные связи: альфа-глюканфосфорилаза и альфа-амилаза; амило-1,6-глюкозидаза соответственно [2, 3].

Объектами настоящего исследования являлись длиннопалые речные раки *Pontastacus leptodactylus* L. Патологию вызывали двумя способами:

1. Введением аллоксана путем диффузии в вентральный синус в дозе 50 и 100 мг/кг.

2. Кормлением кормами с содержанием жира выше 17% (комбикорм для форели и сига «craft soft light»).

Кроме того, раков кормили личинками хиронамид по нормам, установленным при проведении трофологических исследований [6].

Продолжительность опыта составляла 1,5 мес. Были взяты клинически здоровые раки. В процессе эксперимента произошло их поражение ржавопятнистым заболеванием (РПЗ), вызванным грибом *Saprolegnia parasitica*. Вероятно, на фоне развивающейся патологии их организм оказался более подверженным внедрению возбудителей.

Результаты исследований показали, что через 3 дня после введения аллоксана содержание глюкозы в гемолимфе речных раков было невелико, что характерно для здоровых особей (рис. 1). Затем, к 7-му дню, наступает повышение уровня

глюкозы в гемолимфе и не меняется до конца эксперимента.



Рис. 1. Динамика изменений уровня глюкозы под действием аллоксана (50 мг/кг) и кормления кормами с повышенным для речного рака содержанием жира.

Наблюдалась гибель речных раков на 3-й и на 23-й день после введения 100 мг/кг аллоксана.

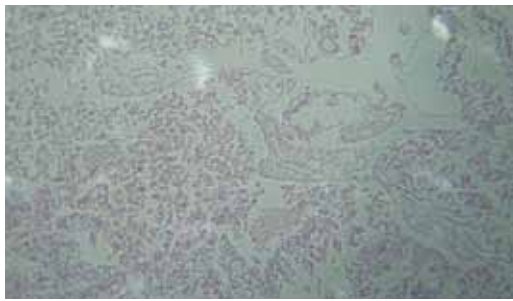
Патологоанатомические изменения гепатопанкреаса: увеличение органа, дряблая консистенция, серо-зеленоватый цвет (рис. 2). У здорового речного рака гепатопанкреас имеет плотную консистенцию и красновато-коричневый цвет.



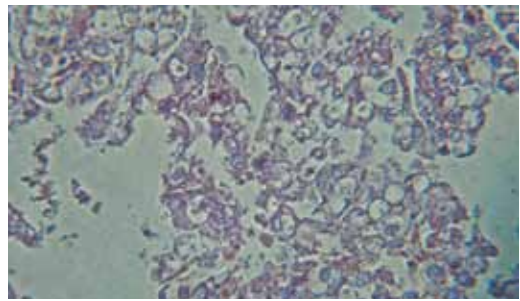
Рис. 2. Вскрытие погибшего речного рака *Pontastacus leptodactylus* L.

Гистологические исследования показали, что в ткани гепатопанкреаса происходит вакуолизация цитоплазмы R-клеток после введения аллоксана в дозе 100 мг/кг (рис. 3).

Таким образом, при введении аллоксана в дозе 100 мг/кг отмечается патология гепатопанкреаса длиннопалых речных ра-



А



Б

Рис. 3. Гистологическая картина гепатопанкреаса длиннопалого речного рака *Pontastacus leptodactylus* L. Окраска гематоксилин-эозином. Вакуолизация цитоплазмы R-клеток.

А — увеличение 10×10;

Б — увеличение 10×40.

ков. Это обнаружено по динамике уровня глюкозы в крови, а также по результатам гистологических исследований.

Список литературы

1. **Артюков А.А., Мензорова Н.И., Козловская Э.П., Кофанова Н.Н., Козловский А.А., Рассказов В.А.** Ферментный препарат из гепатопанкреаса промышленных видов крабов и способ его получения. Патент № 2280076, заявка № 2004135771 от 20.07.2006 г.
2. **Джунковская А.В., Захарова Н.В.** Панкреатическая эластаза — новая сериновая протеаза, выделенная из гепатопанкреаса камчатского краба // Всесоюз. совещ. «Биологически активные вещества гидробионтов — новые лекарственные, лечебно-профилактические и технические препараты»: Тез. Докладов. — Владивосток: ТИНРО. 1991. 8 с.
3. **Калчугина Е.П., Леваньков С.В., Купина Н.М.** Динамика изменения содержания гликогена в гепатопанкреасе камчатского краба в результате автолитических процессов // Известия ТИНРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохо-
- зайственного центра). Владивосток. 2001. Т. 129: Биохимия и биотехнология гидробионтов. С. 203-214.
4. **Пономарев А.К.** Гистологический и гистохимический анализ гаметогенеза и состояния гепатопанкреаса у *Procambarus Clarkii* при различных вариантах кормления // Дисс. канд. Биол. наук. — М., 2003. 120 с.
5. **Рязанова Т.В.** Патологические изменения органов и тканей у краба-стригуна опилю (*Chionoecetes opilio*) на западно-камчатском шельфе Охотского моря // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и Северо-западной части Тихого океана — 2006. Вып. 8. С. 207-216.
6. **Тамкявичене Е.А.** Некоторые количественные закономерности питания широкопалого рака. Литв.: Сб. научн. тр. // Ин-т зоол. и паразитол. АН Лит. ССР. — 1979. — С. 67-76.
7. **Harrison F.W., Humes A.G.** Microscopic anatomy of invertebrates. Decapoda Crustacea. — New York: Willey-Liss Inc., 1992. Vol.10. 459 p.
8. **Johnson P.T.** Histology of the blue crab, *Callinectes sapidus*: a model for the Decapoda. — New York: Praeger. 1980. 440 p.

Artificially caused hepatopancreas's pathology of river crayfish

N.Yu. Koryagina, G.I. Pronina, A.O. Revyakin, O.I. Stepanova,
O.V. Baranova, G.D. Kapanadze, I.Yu. Menshikov

The injection of alloxan in a dose of 100 mg/kg in a ventral sine of river crayfish leads to violation of structure of R-cages of hepatopancreas. The increase of glucose content in a hemolymph is noted.

Key words: pathology modeling, river crayfish, hepatopancreas, alloxan (C₄H₂N₂O₄).

Влияние мелаксена на функциональную активность тромбоцитов в условиях экспериментальной гипо- и гиперагрегации

Е.Н. Лазарева, Х.М. Галимзянов, М.А. Самотруева

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России

Контактная информация: Лазарева Елена Николаевна, elniklazareva@yandex.ru

В работе представлены данные, полученные при экспериментальном изучении регулирующего действия синтетического аналога мелатонина — мелаксена — на процессы функционирования тромбоцитов в условиях их гипо- и гиперагрегации. Гипоагрегационную модель нарушений функции тромбоцитов индуцировали введением ацетилсалициловой кислоты (per os в дозе 20 мг/кг). Гиперагрегация была вызвана внутрибрюшинным введением 0,1мл 10% раствора кальция хлорида. Изучали активность мелаксена при применении в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг. Установлено, что мелаксен в дозе 1 мг/кг обладает корректирующей способностью, уменьшая формирующиеся в условиях экспериментальной гипо- и гиперагрегации нарушения функциональной активности тромбоцитов.

Ключевые слова: мелаксен, тромбоциты, нарушения гемостаза, ацетилсалициловая кислота, кальция хлорид.

Введение

Одним из ключевых механизмов гемостаза является сбалансированное функционирование тромбоцитов, где повышение их агрегационной способности может спровоцировать усиление тромбообразования, а снижение — развитие геморрагического синдрома [4].

Многочисленными экспериментальными и клиническими данными показано, что гиперагрегация тромбоцитов имеет причинно-следственную связь с развитием таких тяжелых патологических состояний как инфаркт миокарда, нарушения мозгового кровообращения, сахарный диабет, гипертоническая болезнь и др.,

при прогрессировании которых нарастает гиперкоагуляция крови и депрессия фибринолиза. В настоящее время профилактические и терапевтические подходы к вышеуказанным заболеваниям базируются на применении таких антиагрегантов как пентоксифиллин, тиклопедин, ацетилсалициловая кислота и др. Однако широко известно, что недостатком этих препаратов являются геморрагические осложнения, тромбоцитопения и лейкопения, агранулоцитоз, выраженные аллергические реакции, а также невозможность использования при выраженном склерозе коронарных сосудов и сосудов мозга, при обострении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, заболеваниях печени и др. [5]. Кроме того, важно отметить тот факт, что при длительном применении этих средств возможно развитие к ним толерантности с последующей активацией процессов тромбообразования [10, 11].

Причиной геморрагических осложнений является пониженная агрегационная способность тромбоцитов, формирующаяся нередко на фоне применения препаратов с антиагрегационной активностью. В практической медицине также существуют способы их устранения, применение которых оправдано при наличии выраженной клинической симптоматики геморрагического синдрома. Так, например, использование тромбоконцентрата направлено на восполнение тромбоцитов в кровяном русле; применение таких препаратов как адроксон и дицинон, обладающих антигиалуронидазной активностью, сопровождается стимуляцией образования тромбопластина [8].

Принимая во внимание вышесказанное, становится очевидным, что большинство препаратов, влияющих на функциональную активность тромбоцитов, имеют

однонаправленное действие. В связи с чем, актуальными являются работы, направленные на расширение арсенала препаратов, обладающих способностью регулировать агрегационные свойства тромбоцитов в зависимости от направленности нарушений в системе гемостаза.

В последнее время в литературе стали появляться многочисленные данные о ведущей роли мелатонина как регулятора большинства биологических процессов в организме [1, 2]. Интерес вызывают работы, свидетельствующие о важной роли данного эпифизарного гормона в регуляции тромбоцитарного звена гемостаза как при физиологических, так и патологических состояниях организма. Так, Ю.И. Редькиным с соавт. (2004) в эксперименте на крысах-самцах был обнаружен дозозависимый эффект мелатонина в отношении тромбоцитарного звена гемостаза при травматической болезни. Однократное введение мелатонина в дозе 10 мг/кг вызывало увеличение количества тромбоцитов и повышение их агрегационной функции. При регулярном введении мелатонина из расчета 0,1 мг/кг наблюдалось снижение тромбоцитоза и усиление процессов дезагрегации [9]. В исследованиях М. Todisco и N. Rossi (2002) описано положительное влияние мелатонина у больных с идиопатической тромбоцитарной пурпурой. При ежедневном приеме физиологической дозы гормона в течение 3-х мес. у пациентов была достигнута ремиссия на 3 года [12].

В связи с вышесказанным, представляется целесообразным изучение влияния мелатонина на функциональное состояние кровяных пластинок при патологии системы гемостаза. Целью данного исследования являлось экспериментальное изучение регулирующего действия синтетического аналога мелатонина —

мелаксена — на процессы функционирования тромбоцитов в условиях их гипо- и гиперагрегации.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на 96 белых нелинейных крысах обоего пола в возрасте 5-7 мес. и массой 200 г, полученных из питомника ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия». В группах самцы и самки были распределены поровну. Исследование проводили в осенне-зимний период; животные содержались в стандартных условиях вивария и были синхронизированы по питанию при свободном доступе к воде. Следует подчеркнуть, что животные находились в условиях чередования естественного и искусственного освещения для блокирования синтеза эндогенного мелатонина и влияния его на гемостаз. На момент проведения исследования самки находились в стадии диэструса. Гипоагрегационную модель нарушений функции тромбоцитов индуцировали введением ацетилсалициловой кислоты (рег ос в дозе 20 мг/кг), которая способна необратимо блокировать циклооксигеназный путь синтеза тромбоксана, тем самым вызывая стойкую дезагрегацию тромбоцитов. Гиперагрегация была вызвана внутрибрюшинным введением 0,1 мл 10% раствора кальция хлорида. Мелаксен (ЮНИФАРМ, США) вводили рег ос в течение 7 сут, однократно. Животные были разделены на группы (n=8): контрольная группа (эквивалентный объем 0,9% раствора натрия хлорида); группы «негативного» контроля (животные с моделью гипо- или гиперагрегации); группы «позитивного» контроля (мелаксен в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг); опытные группы были сформированы из животных с моделью гипо- или гиперагрегации, получавших мелаксен в дозах 1

мг/кг или 10 мг/кг. Особенности распределения животных по группам представлены в таблицах 1 и 2.

Особенности функционирования тромбоцитов изучали на основании показателей гемолизат-агрегационного теста (ГАТ): агрегационная активность одного тромбоцита (ААТ) в максимальной (-2) и минимальной (-6) дозе гемолизата как индуктора АДФ-агрегации тромбоцитов; индекс активации тромбоцитов (ИАТ) [3].

Исследование проводили в соответствии с существующими международными этическими и научными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных [7]. Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакетов программ: Microsoft Office Excel 2007, BIOSTAT 2008 Professional 5.1.3.1; с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони [6]. Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При анализе параметров гемолизат-агрегационного теста в группе животных, получавших мелаксен, было выявлено, что на фоне введения препарата в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг происходило незначительное снижение количества тромбоцитов относительно контроля, однако уровень активных тромбоцитов не изменялся (см. табл. 1 и 2), что свидетельствует об отсутствии влияния препарата при неизменной активности системы гемостаза. Хотелось бы отметить результаты, которые мы получили в условиях экспериментальной индукции патологии системы гемостаза.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, введение ацетилсалициловой кислоты не сопровождалось снижением

количества тромбоцитов, однако их агрегационная активность была полностью «заблокирована», что проявлялось выраженным снижением показателей, отражающих агрегационную активность одного тромбоцита, а также индекса активации тромбоцитов. На фоне введения мелаксена животным с явлениями «аспириновой» гипоагрегации отмечалась активация функционирования тромбоцитов, при этом значимых изменений в количестве тромбоцитов не наблюдали. Под влиянием мелаксена в дозе 1 мг/кг дезагрегационное действие ацетилсалициловой кислоты уменьшалось: агрегация тромбоцитов была восстановлена на фоне введения как высоких, так и низких доз АДФ, при этом в условиях применения ААТ(-6) агрегационная активность практически достигала параметров «нормы» у контрольной груп-

пы животных (см. табл. 1).

Применение мелаксена в дозе 10 мг/кг также не сопровождалось значимыми изменениями количества тромбоцитов, но при этом их агрегационная способность, несмотря на введение ацетилсалициловой кислоты, сохранялась. Показатели функциональной активности тромбоцитов в опытной группе достоверно приближались к значениям контрольной группы (см. табл. 1).

Уровень активных тромбоцитов у животных, получавших мелатонин в исследуемых дозах на фоне ацетилсалициловой кислоты, возрастал практически в 1,5 раза, отмечено увеличение показателей не только относительно группы животных с экспериментальной патологией, но и по сравнению с контрольными значениями (табл. 1).

Таблица 1

Влияние мелаксена на функциональную активность тромбоцитов в условиях экспериментальной гипоагрегации

Показатели ГАТ Группы животных	Количество тромбоцитов (M±m, x 10 ¹² /л)	ААТ(-2) (M±m, %)	ААТ (-6) (M±m, %)	ИАТ (M±m)
Контроль: физ.раствор (n = 8)	852,0 ± 53,1	150,6±18,2	308,0 ± 22,7	2,6 ± 0,31
Ацетилсалициловая кислота (20 мг/кг) (n = 8)	766,0 ± 49,5	0***	0***	0***
Мелаксен (1 мг/кг) (n = 8)	720±21,8*	171,0±28,1	294,5 ± 30,5	2,3 ± 0,31
Ацетилсалициловая кислота (20 мг/кг) + Мелаксен (1мг/кг) (n = 8)	1007,2± 7,1 ^{◇◇} #	72,0±12,0 ^{###}	275,9±36,7 ^{###}	4,6±0,62 ^{**} ^{###} ^{◇◇}
Мелаксен (10 мг/кг) (n = 8)	810,0 ± 45,6	179,4 ± 26,4	298,2 ± 24,9	2,5 ± 0,27
Ацетилсалициловая кислота (20 мг/кг) + Мелаксен (10 мг/кг) (n = 8)	978,6 ± 61,6	159,5±19,2 ^{###}	351,0±24,1 ^{###}	4,0±0,16 ^{#####} ^{◇◇}

Примечание: ГАТ — гемолизат-агрегационный тест; ААТ(-2) — агрегационная активность тромбоцита при максимальной дозе АДФ; ААТ(-6) — агрегационная активность тромбоцита при минимальной дозе АДФ; ИАТ — индекс активации тромбоцитов.

* — p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001 степень достоверности относительно контроля;

— p<0,05; ## — p<0,01; ### — p<0,001 степень достоверности относительно животных, получавших ацетилсалициловую кислоту;

◇ — p<0,05; ◇◇ — p<0,01; ◇◇◇ — p<0,001 степень достоверности относительно животных, получавших мелаксен.

Анализ результатов гемолизат-агрегационного теста в группе животных, получавших кальция хлорид, подтвердил формирование экспериментальной модели гиперагрегации, проявляющейся выраженным увеличением агрегационной активности тромбоцитов независимо от дозы индуктора. Данные изменения, вероятно, обусловлены увеличением притока Ca^{2+} в тромбоциты, при этом количество их активных форм не изменялось (ИАТ). У животных опытной группы под влиянием мелаксена, применяемого в дозе 1 мг/кг, на фоне достоверного повышения количества тромбоцитов и увеличения

активных форм, их агрегационная способность под влиянием высоких доз АДФ достоверно снижалась, практически достигая контрольных значений (табл. 2).

Под влиянием мелаксена, применяемого в дозе 10 мг/кг, у животных с гиперагрегационной моделью нарушения гемостаза активность тромбоцитов не восстанавливалась. Следует отметить, что на фоне применения минимальных доз АДФ мелаксен в дозе 10 мг/кг еще в большей степени «простимулировал» агрегационную активность тромбоцитов. Индекс активации тромбоцитов во всех группах практически не изменялся (табл. 2).

Таблица 2

Влияние мелаксена на функциональную активность тромбоцитов в условиях экспериментальной гиперагрегации

Показатели ГАТ Группы животных	Количество тромбоцитов ($M \pm m$, $\times 10^{12}/л$)	ААТ(-2) ($M \pm m$, %)	ААТ (-6) ($M \pm m$, %)	ИАТ ($M \pm m$)
Контроль: физ.раствор (n = 8)	852,0 ± 53,1	150,6±18,2	308,0 ± 22,7	2,6 ± 0,31
Кальция хлорид (0,1 мл 10% раствор) (n = 8)	904,6 ± 67,3	236,3 ± 24,1**	421,6 ± 19,9**	2,3 ± 0,12
Мелаксен (1 мг/кг) (n = 8)	720,0 ± 21,8	171,0 ± 28,1	294,5 ± 30,5	2,3 ± 0,31
Кальция хлорид (0,1 мл 10% раствор) + Мелаксен (1 мг/кг) n = 8	1091,0±13,6	170,1±19,0 #	385,7±14,8	3,1±0,17###
Мелаксен (10 мг/кг) (n = 8)	810,0 ± 45,6	179,4 ± 26,4	298,2 ± 24,9	2,5 ± 0,27
Кальция хлорид (0,1 мл 10% раствор) + Мелаксен (10 мг/кг) (n = 8)	888,0 ± 55,2	238,1 ± 17,3**	487,3± 16,4* #	2,1 ± 0,19

Примечание: ГАТ — гемолизат-агрегационный тест; ААТ(-2) — агрегационная активность тромбоцита при максимальной дозе АДФ; ААТ(-6) — агрегационная активность тромбоцита при минимальной дозе АДФ; ИАТ — индекс активации тромбоцитов.

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ степень достоверности относительно контроля;

— $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$; ### — $p < 0,001$ степень достоверности относительно животных, получавших кальция хлорид;

◇ — $p < 0,05$; ◇◇ — $p < 0,01$; ◇◇◇ — $p < 0,001$ степень достоверности относительно животных, получавших мелаксен.

Таким образом, анализ результатов гемолизат-агрегационного теста, полученных при изучении дозозависимого влияния мелаксена на функциональную активность тромбоцитов, показал, что мелаксен в дозе 1 мг/кг обладает корректирующей способностью, уменьшая формирующиеся в условиях экспериментальной гипо- и гиперагрегации нарушения гемостаза. Так, при введении препарата в указанной дозе на фоне «аспириновой» гипоагрегации уменьшается дезагрегационный эффект ацетилсалициловой кислоты; в условиях «кальциевой» гиперагрегации мелаксен, напротив, снижает агрегационную активность тромбоцитов. Данное исследование после проведения работ по изучению клинической эффективности мелаксена в указанных условиях позволит оптимизировать фармакотерапию состояний, сопровождающихся нарушениями со стороны системы гемостаза.

Список литературы

1. **Арушанян Э.Б., Бейер Э.В.** Мелатонин и система крови // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2006. № 3. С. 74-79.
2. **Арушанян Э.Б., Бейер Э.В., Масягина О.А., Масягин С.С., Сидоренко Ж.И.** Влияние мелатонина на некоторые гематологические показатели у здоровых людей // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2006. № 5. С. 36-38.
3. **Баркаган Л.З., Архипова Б.Ф., Куческого В.М.** Медицинские лабораторные технологии // Рук-во по клинической лабораторной диагностике / Под ред. А.И. Карпищенко. СПб.: Интермедика. 1999. 656 с.
4. **Баркаган Л.З., Момонт А.П.** Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Издание 2-е дополненное. М.: Ньюдиамед. 2001. 296 с.
5. **Белоусов Ю.Б., Леонова М.В., Белоусов Д.Ю.** Основы клинической фармакологии и рациональной фармакотерапии / Рук-во для практикующих врачей // Под ред. Ю.Б. Белоусова, М.В. Леоновой. М.: Бионика. 2002. 368 с.
6. **Гланц С.** Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 1999. 459 с.
7. **Курзанов А.Н.** Экспериментальные исследования в ракурсе биоэтики // Вестник Международной академии наук. 2007. № 1. С. 7-13.
8. **Михайлов И.Б.** Настольная книга врача по клинической фармакологии / Рук-во для врачей. СПб: Фолиант. 2001. 736 с.
9. **Редькин Ю.В., Лысенко А.С., Голевцова З.Ш., Лобов В.В.** Влияние мелатонина на тромбоцитарный гемостаз при травматической болезни // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2004. № 4. С. 41-43.
10. **Chen W., Lee P., Ng W.** Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment // J. Am. Coll. Cardiol. 2004. Vol. 43. P. 1122-1126.
11. **Dalen J.E.** Aspirin Resistance: Is it Real? Is it Clinically Significant? // Am. J. Med. 2007. Vol. 120. № 1. P. 1-4.
12. **Todisco M., Rossi N.** Melatonin for refractory idiopathic thrombocytopenic purpura: a report of 3 cases // Am. J. Ther. 2002. Vol. 9. P. 524-526.

The influence of melaxen on the function of thrombocytes in the experimental hypo- and hyperaggregation

E.N. Lazareva, Kh.M. Galimzyaynov, M.A. Samotrueva

The work presents the data which were obtained in the experimental study of the regulatory action of the synthetic analog of melatonin – melaxen – on the functioning of the thrombocytes under conditions of hypo- and hyperaggregation. Hypoaggregation`s model of the thrombocytes dysfunction induced by introduction of acetylsalicylic acid (per os in dose of 20 mg/kg). Hyperaggregation was caused by the intraperitoneal injection of 0.1 ml of a 10% solution of calcium chloride. We studied the activity of melaxen in doses of 1 mg/kg and 10 mg/kg. In our experimental work was found that melaxen in dose 1 mg/kg has correcting capability, reducing dysfunction of the thrombocytes which formed in experimental hypo- and hyperaggregation.

Key words: melaxen, thrombocytes, disruption of homeostasis, acetylsalicylic acid, calcium chloride.

Особенности организменного ответа мышей разных линий на острое гамма-облучение

Ю.С. Медведева¹, Е.Н. Архипова¹, И.Б. Алчинова¹, М.А. Озерова²,
А.С. Бобе¹, Ц.Ц. Содбоев², А.А. Антипов², М.Ю. Карганов¹

¹ – ФГБУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва

² – ФГОУ ВПО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва

Контактная информация: д.б.н., проф. Карганов Михаил Юрьевич, mkarganov@mail.ru

Действие ионизирующего излучения приводит к истощению пула стволовых клеток, увеличивает нагрузку на дифференцированные клетки, в результате усиливаются процессы репарации и апоптоза. Наряду с хорошо документированными острыми эффектами, радиотерапия приводит и к отсроченным, проявляющимся спустя годы после успешного лечения. Целью нашей работы было формирование и апробация комплекса тестов для определения последствий облучения с учетом различной радиочувствительности организма. Наблюдали общий сдвиг вклада в светорассеяния в сторону более мелких частиц у линий 101/Hf и СЗН/Sn, тогда как у мышей линии С57BL отмечали увеличение доли частиц большого диаметра. Гистологическое исследование показало, что в печени мышей линии С57BL, в отличие от других линий, отмечается уменьшение частоты встречаемости тяжелых повреждений к окончанию эксперимента. Такая же тенденция у этой линии обнаружена в ткани поджелудочной железы, а противоположная – в ткани селезенки. Таким образом, мышцы линии С57BL реагируют на облучение намного позже, чем линии 101/Hf и СЗН/Sn, при этом их адаптивность достаточно высока. Животные линии СЗН/Sn лучше всех выходят из радиационного кризиса.

Ключевые слова: облучение, межлинейные различия, лазерная корреляционная спектроскопия.

Современный уровень развития технологий заставляет все чаще рассматривать индивидуальные особенности реакций организма на воздействие экстремаль-

ных факторов. Ответом на любое экстремальное воздействие является активация общих систем адаптации, однако скорость их развития, степень экспрессии,

а главное, степень истощения и развитие компенсаторных реакций могут различаться. Именно от этих факторов в конечном счете зависит жизнеспособность организмов. Определение индивидуальных адаптивных особенностей человека затруднено ввиду значительного генотипического разнообразия и проводится, в основном, на физиологическом уровне с использованием нагрузочных тестов. Поэтому целесообразно совместно с ними проводить тесты, которые могут адекватно отразить изменения, происходящие на клеточном и биохимических уровнях, которые, в свою очередь, создают основу не столько для проявлений на уровне физиологии, сколько модифицируют предел изменений адаптационных и компенсаторных реакций.

Целью настоящего исследования было изучение межлинейных различий адаптивных возможностей организма мышей при воздействии экстремального фактора среды.

Материалы и методы

В исследовании использовали три линии мышей — 101/Hf, C3H/Sn и C57BL из коллекционного фонда Научного центра биомедицинских технологий ФМБА.

Несмотря на то, что процессы, вызываемые в организме лабораторных животных, некорректно напрямую переносить на человека, изменения, возникающие при действии факторов различной природы, позволяют определить направление поиска.

При сравнении различных линий мышей под воздействием облучения описано, что наиболее чувствительной к летальному действию облучения была линия BALB/cJ, а наиболее резистентной — 129/J. Линия 101/Hf в экспериментах с химическими мутагенами оказалась

наиболее чувствительной к мутагенному действию алкилирующих агентов, что, видимо, обусловлено дефектом системы эксцизионной репарации [5].

Облучение опытной группы мышей (C3H/Sn, n=9; 101/Hf, n=6; C57BL, n=12) проводили на цезиевом облучателе «Панорама» до общей дозы 750 рентген (Московская ветеринарная академия им. К.И. Скрябина). Контрольные группы (C3H/Sn, n=7; 101/Hf, n=10; C57BL, n=12) не подвергались облучению.

Измерение массы животных проводили на весах марки Mettler Toledo, за 1 ч до взвешивания животных лишали корма.

Забор крови у мышей проводили из малой подкожной вены голени через 3 дня, а также через 3 и 6 недель после облучения [10]. Субфракционный состав сыворотки крови мышей изучали с помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии. Данный метод позволяет определить соотношение частиц разного размера в различных биологических жидкостях (сыворотке крови, моче и т.д.). Для многокомпонентных образцов результатом обработки является кривая с несколькими выраженными пиками. Сравнение площадей под кривой позволяет определить изменение процентного вклада в светорассеяние частиц разного размера [3, 12, 13]. Для характеристики смещения размеров частиц было принято целесообразным разделить всю область размеров на несколько интервалов. Для гистограмм сыворотки крови мышей можно выделить три основных интервала: 1 — от 0 до 20,58 нм; 2 — от 20,58 до 91,26 нм; 3 — свыше 91,26 нм.

Определение изменения количественных показателей клеток крови происходило путем подсчета лейкоцитарной формулы, которую проводили при иммерсионной микроскопии окрашенных

мазков. Использовалась комбинированная окраска по Паппенгейму [11].

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов (соотношение Т- и В-лимфоцитов) крови у мышей разных линий проводилось методом проточной лазерной цитометрии с использованием моноклональных антител с тройной меткой. В основе метода лежит взаимодействие моноклональных антител, меченных флюоресцентной меткой, с поверхностными антигенами лимфоцитов, и последующий анализ образцов на проточном лазерном цитометре. Однако применение одного типа моноклональных антител, меченных флюорохромом (т.н. «одинарная метка»), не всегда даёт объективную информацию о той или иной популяции лимфоцитов, поскольку каждая клетка несет на своей поверхности одновременно несколько типов антигенов. Более точное и информативное исследование субпопуляций достигается при использовании антител с большим количеством меток, т.е. к образцу крови добавляют одновременно 2, 3 и более моноклональных антител, несущих на себе различные флюоресцентные красители (зелёный — FITC (ФИТЦ) — флюоресцеин-5-изотиоцианат; жёлтый — PE (ФЭ) — фикоэритрин; красный — PE/Cy5 — тандем цианин 5-фикоэритрин).

Для анализа изменений в поведении грызунов после действия сильного стрессогенного фактора использовали установку «Открытое поле». В тесте оценивали вертикальную и горизонтальную двигательную активность. Длительность теста составляла 3 мин. Тестирование проводили в квадратной камере размером 45x45 см, при освещении в 40 Лк. В этом тесте оценивают поведенческие проявления, вызванные конфликтом мотивации страха и исследовательской активности.

При выполнении теста у мышей линии 101/Hf наблюдали попятные движения, описанные для неврологических мутантов hot-foot со структурно-функциональными аномалиями мозжечка [5].

В конце эксперимента все животные были подвергнуты эвтаназии путем передозировки анестезирующего препарата с дальнейшим взятием органов (печень, кишечник, поджелудочная железа, селезенка) для проведения гистологического исследования с целью оценки повреждающего действия облучения. Органы фиксировали в 4% растворе нейтрального формалина. Препараты готовили согласно принятой методике [4, 7].

Для упрощения обработки материала в зависимости от степени изменения морфологии клеток и тканей были выделены три степени тяжести повреждений [1].

Анализ полученных показателей проводили с помощью пакета статистических программ «Statistica 6.0», используя стандартные методы вариационной статистики.

Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 г.

Результаты и их обсуждение

Ионизирующее излучение оказывает на живой организм неспецифическое действие. Организм не способен его ощутить, т.к. энергия ионизирующего излучения слишком мала, и, кроме того, не существует рецепторов, которые могли бы непосредственно ее воспринимать. В отличие от других видов воздействия, гамма-излучение проникает непосредственно и одновременно во все структурные элементы живой системы и влияет

на процессы жизнедеятельности. После облучения поддержание высокого уровня работоспособности клеток, тканей и органов осуществляется в большей степени за счет разрушения собственных жизненно важных структур и постепенного снижения общей устойчивости [2, 6].

Был исследован ряд параметров, каждый из которых может характеризовать ответ отдельной системы организма на облучение.

Одним из комплексных параметров, который объективно характеризовал состояние организма в целом, было изменение массы тела мышей. Из литературы известно, что острое облучение в высоких дозах приводит к стойкому снижению массы тела вследствие развития лучевой болезни [9]. В наших экспери-

ментах зарегистрировано снижение процента прироста массы после облучения в острой дозе. Однако есть данные о том, что облучение может приводить и к развитию метаболического синдрома после воздействия в высоких, но не летальных дозах [14]. Наблюдали снижение массы животных к 6-й неделе у трех линий в контроле и в опыте, исключая опытную группу линии C3H/Sn (рис. 1). У линии C3H/Sn наблюдали уменьшение прироста массы животных в опытной группе на 3-й неделе эксперимента, что, в общем, соответствует развитию острой фазы лучевой болезни. К 6-й неделе, в стадии восстановления, прирост возрастал. Суммарный прирост в контрольной и опытной группах за весь период эксперимента был приблизительно равным.

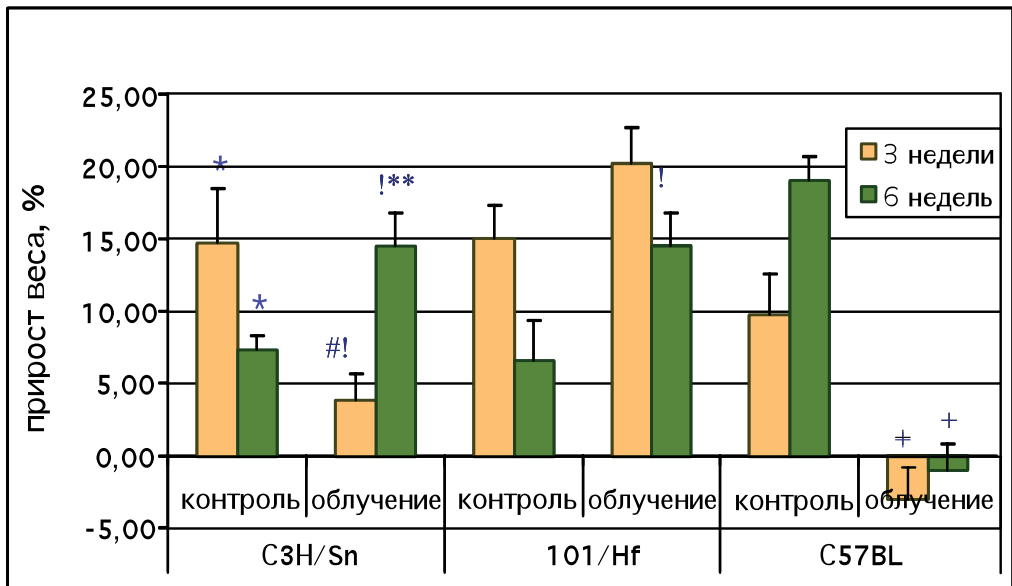


Рис. 1. Изменение прироста массы мышей разных линий, %.

! – $p < 0,05$ отличия опыта от контроля;

– $p < 0,001$ отличия линии C3H/Sn от линии 101/Hf;

+ – $p < 0,001$ отличия линии 101/Hf от линии C57BL;

* – $p < 0,01$, ** – $p < 0,001$ отличия линии C3H/Sn от линии C57BL (критерий Манна-Уитни).

У мышей линии 101/Hf к 3-й неделе прирост массы в опытной и контрольной группах был приблизительно равным. К 6-й неделе прирост массы в опыте был значительно выше, чем в контроле, что может свидетельствовать о развитии метаболического синдрома [14].

У мышей линии C57BL, как и у линии C3H/Sn, наблюдали снижение прироста массы к 3-й неделе, но без его восстановления к 6-й неделе, что свидетельствует о недостаточности восстановительных процессов после облучения.

Таким образом, судя по показателям массы, классический ответ на облучение развивается только у мышей линии C3H/ Sn, т.к. у данных лабораторных животных присутствовала стадия восстановления.

с лабораторными животными, но, к сожалению, не позволяет адекватно определить механизмы происходящих сдвигов.

Изменения в картине крови являются основными признаками при воздействии гамма-излучения в значительных дозах.

Сравнение количества различных форменных элементов в крови мышей разных линий после облучения показало большие различия в содержании палочко- и сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов (рис. 2).

Основным критерием развития лучевой болезни является лимфопения. У мышей линии C57BL эффект облучения наблюдали уже через неделю после воздействия, и к 6-й неделе эксперимента количество лимфоцитов начинало по-

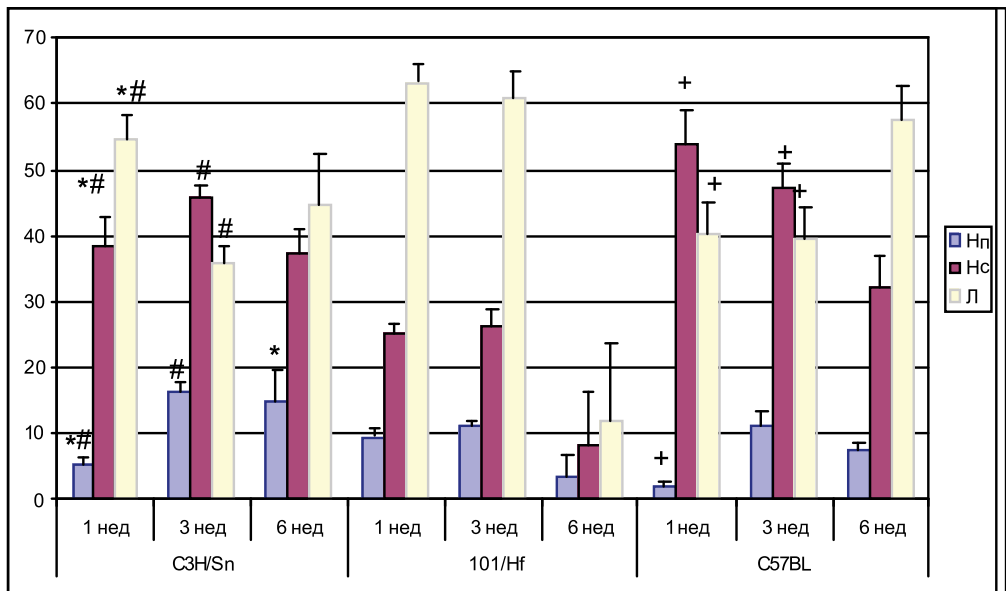


Рис. 2. Процентное содержание количества нейтрофилов и лимфоцитов в мазках крови мышей разных линий после облучения. По оси ординат – количество палочко-, сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в %.

– $p < 0,05$ отличия линии C3H/Sn от линии 101/Hf;

+ – $p < 0,05$ отличия линии 101/Hf от линии C57BL;

* – $p < 0,05$ отличия линии C3H/Sn от линии C57BL (критерий Манна-Уитни).

Процент прироста массы по группе может служить комплексным показателем скорости обменных процессов при работе

вышаться. У мышей линии 101/Hf наблюдали противоположную картину, и к 6-й неделе – выраженную лимфопению.

Мыши линии СЗН/Sp оказались самыми стабильными, незначительное понижение количества лимфоцитов, возникшее к 3-й неделе, восстанавливалось к 6-й неделе.

Определение субпопуляций лейкоцитов в течение эксперимента показало, что общая их численность практически не изменяется во времени у всех трех линий. Однако у линий СЗН/Sp и 101/Hf наблюдалось уменьшение как Т-, так и В-лимфоцитов к 6-й неделе, причем у ли-

римента после почти полного отсутствия Т- и В-лимфоцитов на 3-й неделе (рис. 3).

Действие ионизирующего излучения приводит к истощению пула стволовых клеток, увеличивает нагрузку на дифференцированные клетки, в результате усиливаются процессы репарации и апоптоза. Использование лазерной корреляционной спектроскопии позволяет определить общее направление изменений в сывороточном гомеостазе [12]. По срав-

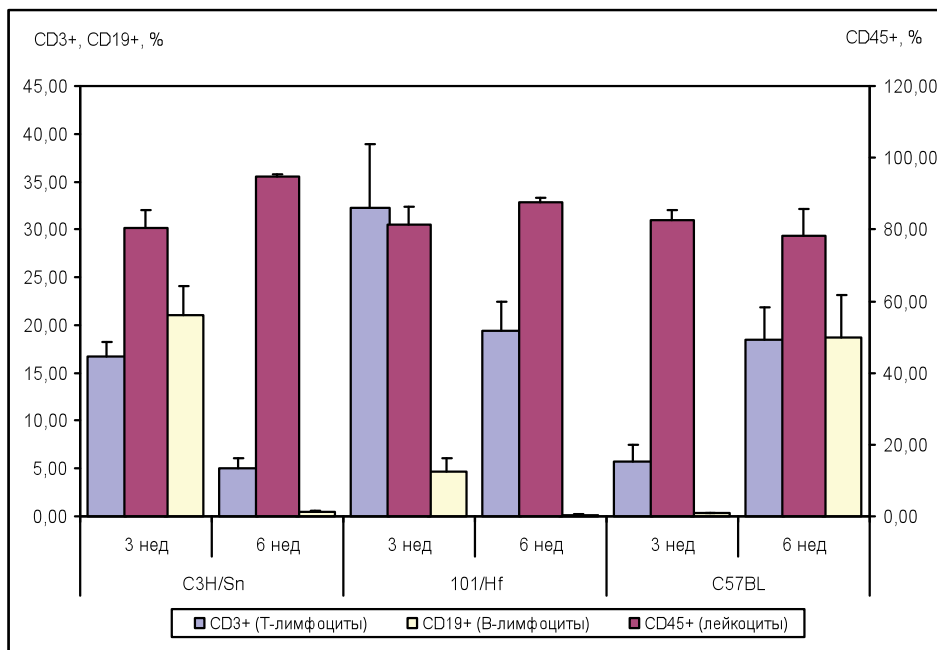


Рис. 3. Процент Т- и В-лимфоцитов у мышей разных линий после облучения.

– $p < 0,05$ отличия линии СЗН/Sp от линии 101/Hf;

+ – $p < 0,05$, ++ – $p < 0,01$ отличия линии 101/Hf от линии С57BL;

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ отличия линии СЗН/Sp от линии С57BL (Критерий Манн-Уитни).

нии СЗН/Sp это было выражено ярче. У линии С57BL отмечали обратный сдвиг в сторону резкого увеличения лимфоцитов обеих популяций. Это свидетельствует об истощении пула Т-, В- и пре-В-лимфоцитов у мышей первых двух линий и восстановлении кроветворной функции у мышей линии С57BL к 6-й неделе экспе-

нению с контрольными значениями, у облученных животных линии 101/Hf наблюдали увеличение процентного вклада в светорассеяние частиц 3-й зоны на 3-й неделе и смещение 2-й зоны в сторону более крупных частиц. К 6-й неделе сохраняется значительный вклад частиц 3-й зоны (рис. 4).

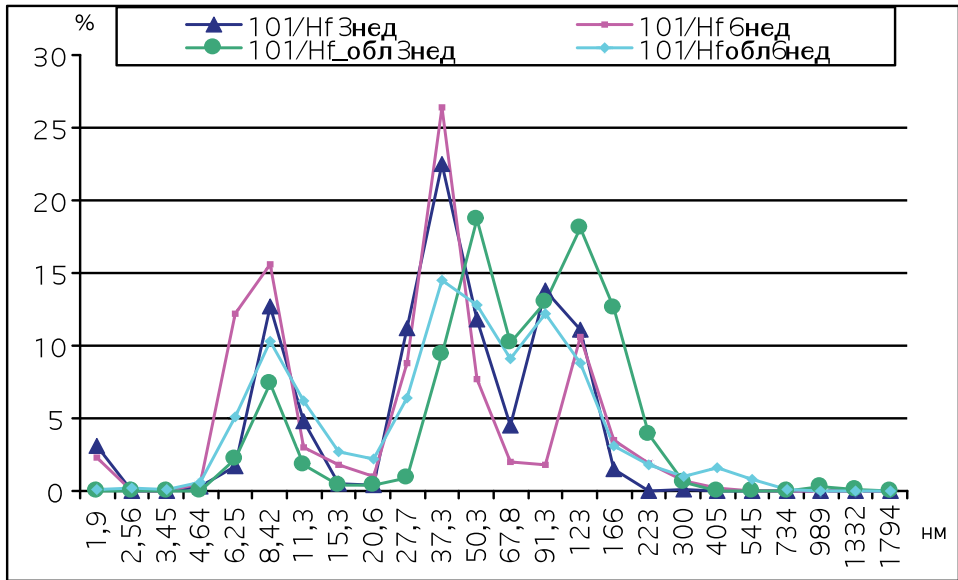


Рис. 4. ЛК-гистограмма сыворотки крови мышей линии 101/Hf на 3-й и 6-й неделях эксперимента. По оси абсцисс – размер частиц в нм, по оси ординат – процентный вклад в светорассеяние.

У мышей линии СЗН/Sp наблюдали значительное увеличение вклада в светорассеяние частиц 3-й зоны за счет уменьшения частиц 1-й зоны. Через 6 недель на-

блюдали появление более крупных частиц в сыворотке крови 2-й зоны по сравнению с контрольной сывороткой (рис. 5).

Для мышей линии С57BL характерно

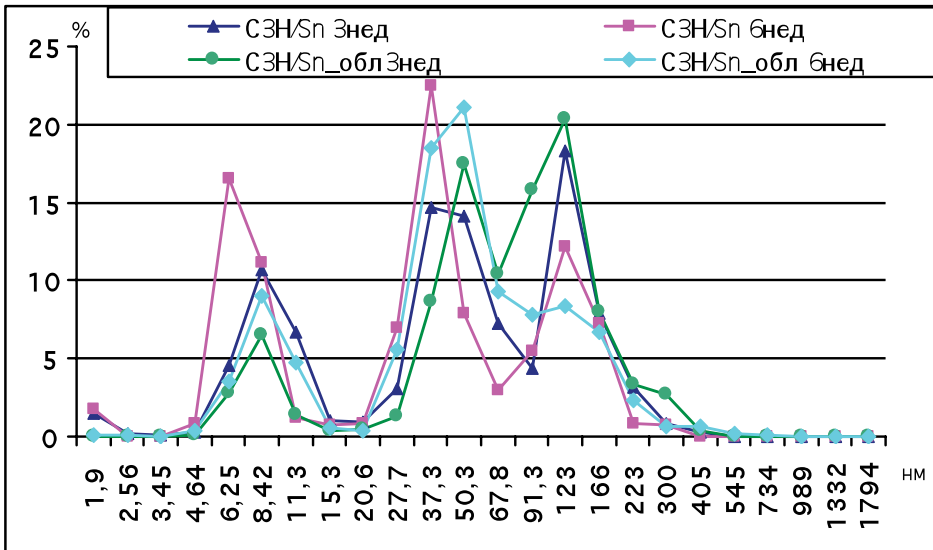


Рис. 5. ЛК-гистограмма сыворотки крови мышей линии СЗН/Sp на 3-й и 6-й неделях эксперимента. По оси абсцисс – размер частиц в нм, по оси ординат – процентный вклад в светорассеяние.

увеличение вклада частиц 2-й зоны через 3 недели эксперимента. К 6-й неделе происходило незначительное перераспределение в сторону более крупных частиц (рис. 6).

Возрастание процентного вклада ча-

Ионизирующее излучение влияет на функциональное состояние нервной системы и поведение в результате как прямого воздействия на нервную систему, так и косвенного, за счет реактивности

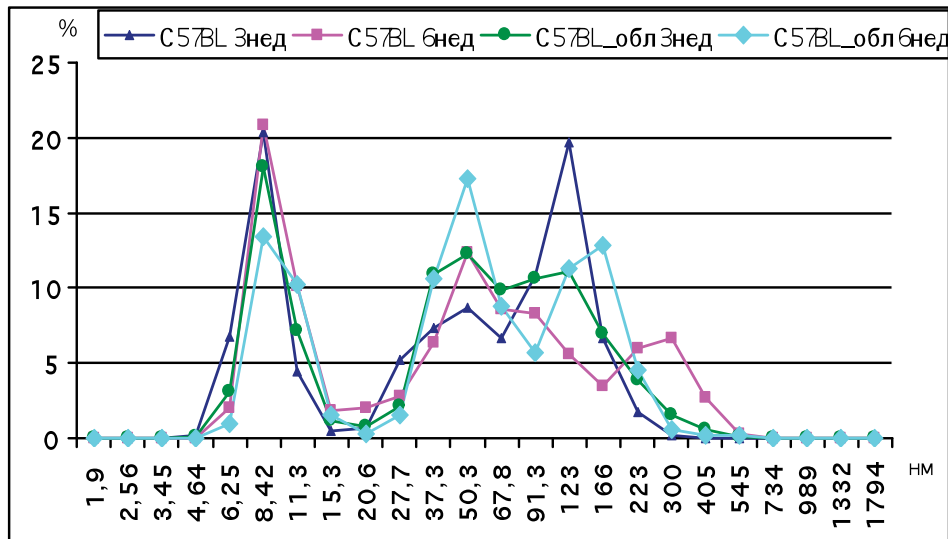


Рис. 6. ЛК-гистограмма сыворотки крови мышей линии C57BL на 3-й и 6-й неделях эксперимента. По оси абсцисс – размер частиц в нм, по оси ординат – процентный вклад в светорассеяние.

стиц крупного размера является показателем развития воспалительного процесса и увеличения количества продуктов деструкции клеток в сыворотке крови [13]. Изменение ЛК-гистограмм у мышей линии 101/Hf в сторону более крупных частиц было самым значительным и длительным. У линии C57BL этот процесс был менее выражен, а в сыворотке крови мышей линии C3H/Sn значительное увеличение на 3-й неделе процентного вклада в светорассеяние частиц 3-й зоны к 6-й неделе сходит на нет.

Положительная динамика в изменении клеточного состава крови у мышей линии C57BL в течение эксперимента согласуется с минимальными изменениями в процентном вкладе в светорассеяние частиц в сыворотке крови.

нервной системы на лучевое повреждение, вызываемое в других системах организма. При этом нервная реактивность может иметь большее интегративное физиологическое значение, чем прямое повреждение нервной системы в сверхлетальных дозах [8]. В тесте «Открытое поле» оценивают поведенческие проявления, вызванные конфликтом мотивации страха и исследовательской активности.

После воздействия радиоактивным излучением мыши линии C57BL снизили горизонтальную двигательную активность в течение 6-ти недель. У мышей линии 101/Hf и C3H/Sn двигательная активность до облучения и после отличалась только на 6-й неделе, где мы видим значительное снижение активности (рис. 7).

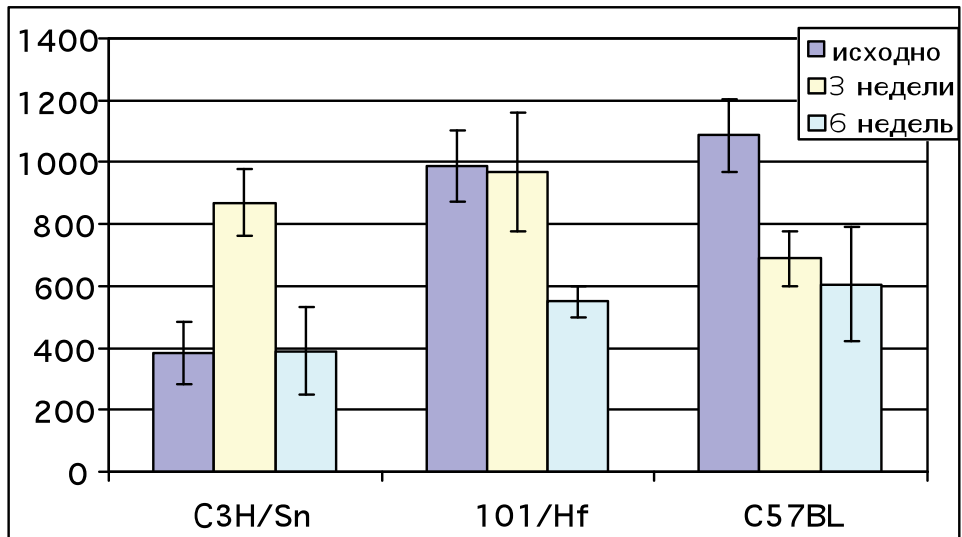


Рис. 7. Изменение горизонтальной двигательной активности у мышей разных линий после облучения, абс. значения.

Похожая картина наблюдалась при сравнении вертикальной двигательной активности мышей линий C3H/Sn и 101/Hf до и после облучения: к 6-й неделе вертикальная активность равна нулю.

У мышей линии C57BL произошло значимое уменьшение вертикальной активности на 1-й неделе и повышение двигательной активности в течение 3-й и 6-й недель (рис. 8).

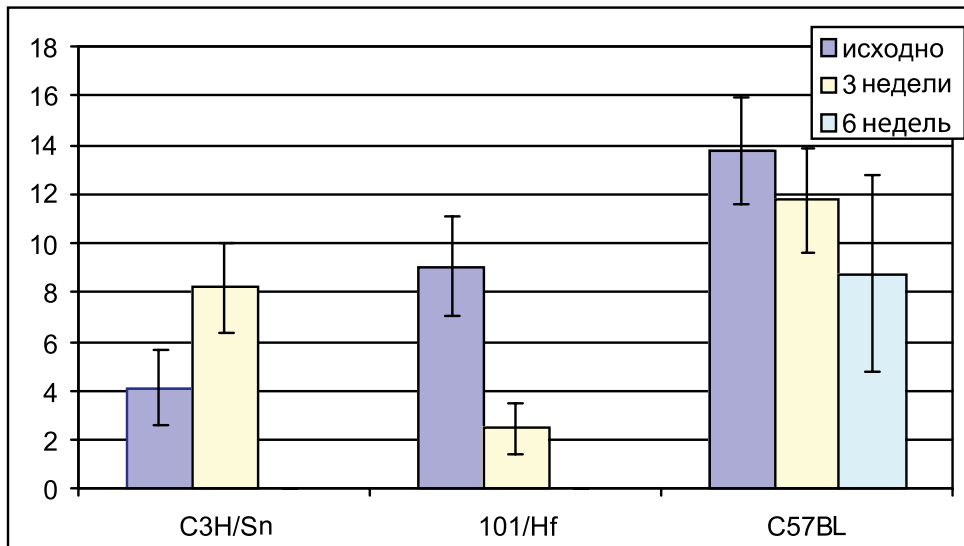


Рис. 8. Изменение вертикальной двигательной активности у мышей разных линий после облучения, абс. значения.

В изменении двигательной активности у животных разных линий можно отметить два типа ответа на воздействие гамма-излучения: срочный выраженный у мышей линии СЗН/Sn и отсроченный ответ, развивающийся только к 6-й неделе, у мышей линии С57BL.

Облучение в острой дозе 750 рентген вызывает деструкцию клеток как в процессе прямого воздействия облучения,

так и в результате образования активных форм кислорода.

У контрольных животных линий 101/Hf и СЗН/Sn, не подвергнутых облучению, ткани тонкого кишечника и печени не были поражены.

У облученных животных изменения тканей тонкого кишечника и печени были представлены в различных степенях тяжести (рис. 9А, Б).

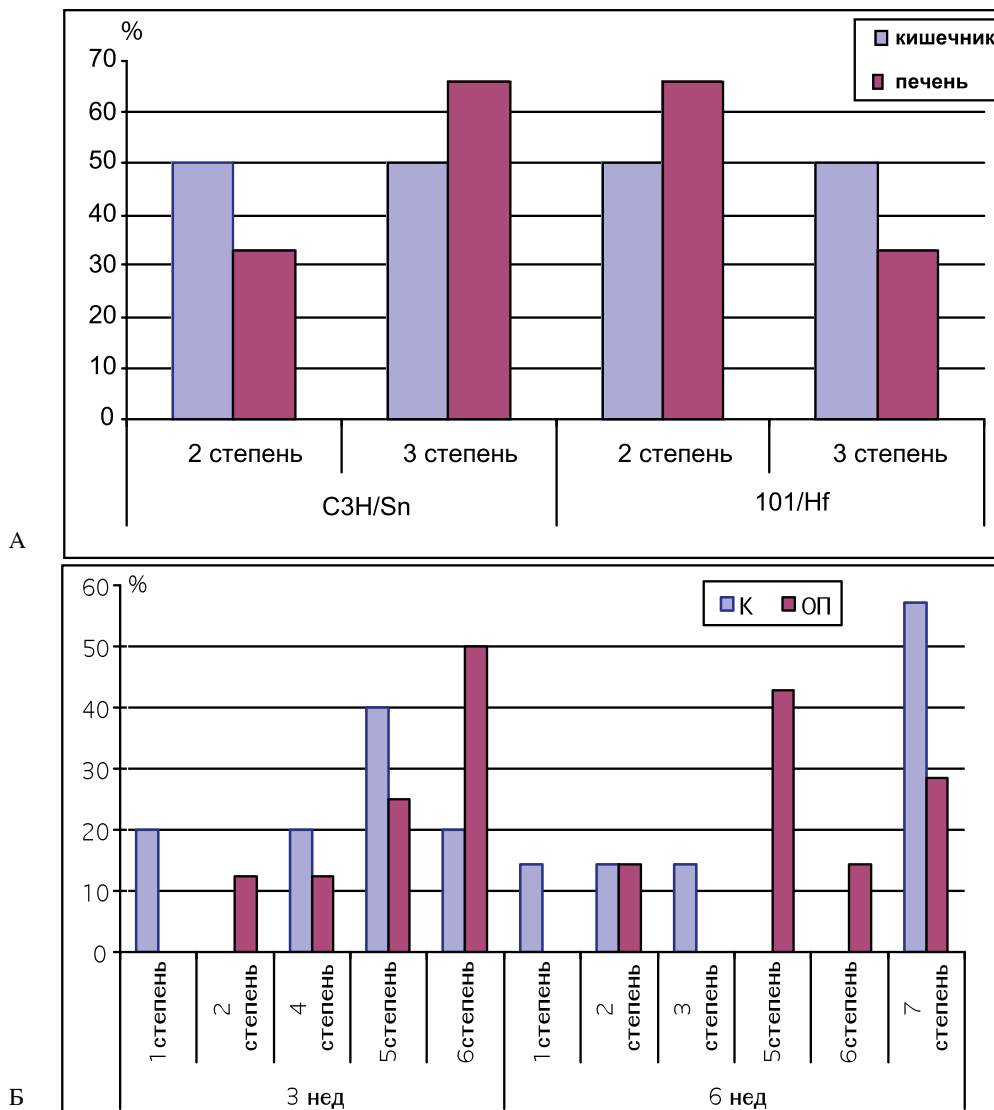


Рис. 9. Частота встречаемости повреждений в тканях тонкого кишечника и печени, %. А – повреждения тканей тонкого кишечника и печени у мышей линий СЗН/Sn и 101/Hf, Б – повреждения ткани печени у мышей линии С57BL.

Для того чтобы отследить динамику повреждения тканей для мышей линии C57BL, были дополнительно исследованы ткани селезенки и поджелудочной железы (рис. 10, 11). Как мы видим, уже

к 3-й неделе эксперимента наблюдался высокий процент животных с тяжелыми повреждениями тканей, и, хотя к 6-й неделе отмечалась положительная динамика, состояние их далеко от нормального.

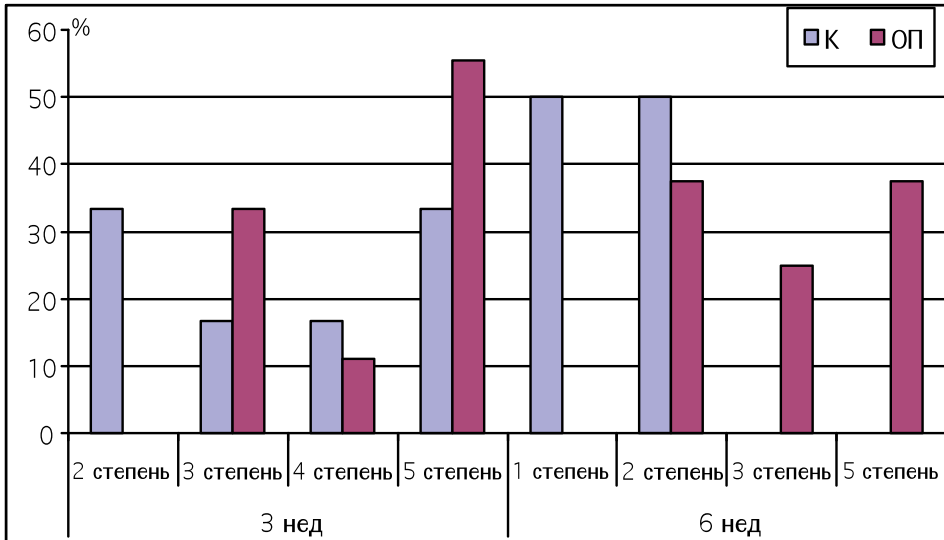


Рис. 10. Частота встречаемости различных степеней поражения тканей селезенки у мышей линии C57BL.

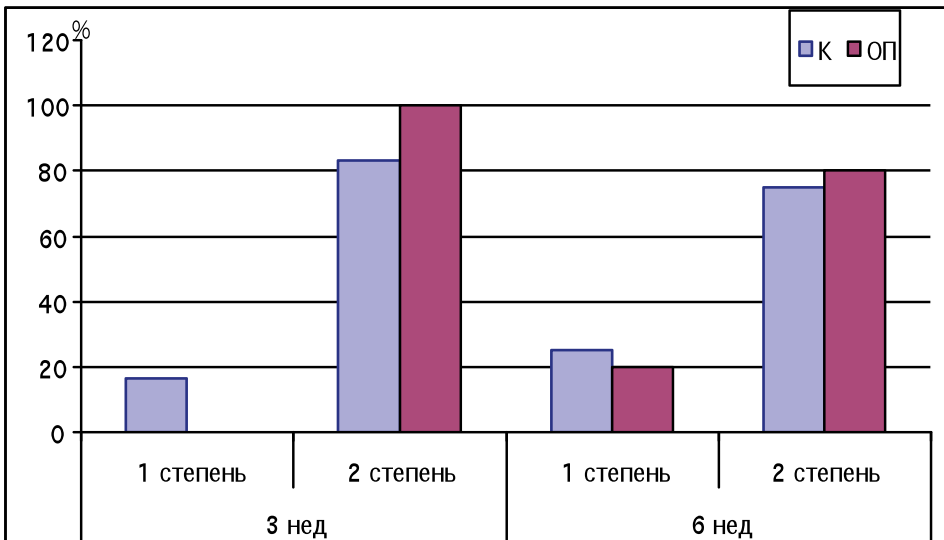


Рис. 11. Частота встречаемости различных степеней поражения тканей поджелудочной железы у мышей линии C57BL.

Заключение

Таким образом, проведенное сравнение чувствительности мышей разных линий к гамма-облучению в острой дозе 750 рентген показывает, что, несмотря на сходство общих реакций тканей и органов, существуют отличия между линиями, выраженность которых определяется их индивидуальными особенностями. Было показано, что мышцы линии С57ВL реагируют на облучение намного позже, чем мышцы линий 101/Нf и СЗН/ Sn, при этом их адаптивность достаточно высока. У мышей линий 101/Нf и СЗН/ Sn острая лучевая болезнь развивается схожим образом, однако линия СЗН/ Sn лучше всех выходит из радиационного кризиса. Заметного улучшения после развития лучевой болезни у мышей линии 101/Нf не наблюдалось.

Использование комплексных критериев позволяет увидеть суммарный результат патологического процесса и работы приспособительных механизмов, а также подобрать подходящий критерий для оценки радиочувствительности. При тестировании новых линий или гибридов использование интегральных показателей позволит определить направление и скорость развития основного патологического процесса.

Список литературы

1. *Архипова Е.Н., Алчинова И.Б., Хлебникова Н.Н., Егорова И.Ю., Бобе А.С., Семенов Х.Х., Антипов А.А., Содбоев Ц.Ц., Карганов М.Ю.* Межлинейные особенности физиологических реакций на разных уровнях организации у мышей при остром облучении // Биомедицина. 2011. №4. С. 43-48.
2. *Кудряшов Ю.Б.* Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: ФИЗМАТЛИТ. 2004. 448 с.
3. *Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А.* Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев: Наукова думка. 1987. 256 с.
4. *Лилли Р.* Патологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир. 1969. 146 с.
5. *Лильн И.Г., Полетаева И.И., Безикоева Ф.З., Иванов В.И.* Поведение мышей линии 101/Н – модели наследственных заболеваний человека с хромосомной нестабильностью // Генетика. 1992. Т.28. №3. С. 87-97.
6. *Мазурик В.К., Михайлов В.Ф.* Радиационно-индуцируемая нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т.41. №3. С. 272-289.
7. *Меркулов Г.А.* Курс патологистологической техники. Л.: Медицина. 1969. 424 с.
8. *Нягу А.И., Логановский К.Н.* Нейропсихиатрические эффекты ионизирующих излучений. Киев: Чернобыльинтеринформ. 1998. 287 с.
9. Радиация и патология / Под общ. ред. А.Ф. Цыба. М.: «Высшая школа». 2005. 341 с.
10. *Степанова О.И.* Метод взятия крови из малой подкожной вены голени у мышей // Биомедицина. 2006. №2. С.137-139.
11. *Яновский Д.Н., Чепелева М.А.* Атлас клинической гематологии: краткое руководство для работников клинических лабораторий. Киев: Здоровье. 1967. 31 с.
12. *Karganov M., Skalny A., Alchinova I., Khlebnikova N., Grabeklis A., Lakarova E., Eisazadeh S.* Combined use of laser correlation spectroscopy and ICP-AES, ICP-MS determination of macro- and

trace elements in human biosubstrates for intoxication risk assessment. – Trace elements and electrolytes. 2011. V.28. №2. P.124-127.

13. *Karganov M., Alchinova I., Arkhipova E., Skalny A.V.* Laser Correlation

Spectroscopy: Nutritional, Ecological and Toxic Aspects. In: “Biophysics”. A.N. Misraed.-InTech. ISBN 2012. 978-953-51-0376-9. P.1-16.

14. <http://donat.kiev.ua/klin9.aspx>

Features organismal response of mice of different lines to acute gamma-irradiation

Yu.S. Medvedeva, E.N. Arkhipova, I.B. Alchinova, M.A. Ozerova, A.S. Bobe, C.C. Sodboev, A.A. Antipov, M.Yu. Karganov

Exposure to ionizing radiation leads to exhaustion of the pool of stem cells, increases differentiated cell stress, and activated repair and apoptosis processes. Apart from well-documented acute effects, radiotherapy leads to delayed effects manifesting in few years after successful treatment. The aim of our study was the development of a test battery for evaluation of irradiation aftereffects in organisms characterized by different radiosensitivity. In C3H/Sn and 101/Hf mice, light scattering spectrum was shifted towards small particles, while in C57BL mice increased contribution of large particles was observed. In 3 weeks, a shift towards larger particles was recorded in all three mouse strains, but its degree varied. By week 6, the histograms approached the control. Histological study showed that the incidence of severe injuries in the liver increased by the end of the experiment in C57BL mice (but not in other mouse strains). The same shifts were observed in the pancreas and an opposite tendency was seen in the spleen. Thus, C57BL mice responded to irradiation later than C3H/Sn and 101/Hf mice, but demonstrated high adaptation capacity. C3H/Sn mice best of all recovered from the radiation crisis.

Key words: irradiation, strain-specific differences, laser correlation spectroscopy.

Моделирование патологии поджелудочной железы у рыб

Г.И. Пронина¹, Н.Ю. Корягина², А.О. Ревякин¹, Г.Д. Капанадзе¹,
О.И. Степанова¹, О.В. Баранова¹, Ю.Б. Львов²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – Государственное научное учреждение ВНИИ ирригационного рыбоводства РАСХН

Внутрибрюшинное введение молоди карпа аллоксана в дозах от 50 до 300 мг/кг вызывает патологию поджелудочной железы. У рыб опытных групп увеличивается содержание глюкозы в крови, нарушается структура островков Лангерганса.

Ключевые слова: моделирование патологии, карп, поджелудочная железа, островки Лангерганса, аллоксан (C₄H₂N₂O₄).

При исследованиях в области медицины нередко возникает необходимость вызывать патологию для нахождения оптимальных способов лечения различных болезней, углубленного изучения функций органов и систем [1, 2].

Задачей данного исследования являлось моделирование патологии поджелудочной железы у рыб.

У некоторых рыб поджелудочная железа представлена в виде отдельных ходов по всей брюшной полости между двумя листками мезентерия, на котором подвешен кишечник. У других рыб, как и у всех прочих позвоночных, поджелудочная железа представлена в виде компактной массы различной формы и величины. Замечено, что некоторые протоки поджелудочной железы у налима впадают непосредственно в пилорические придатки, а у маринки — в полость кишечника [3, 4]. Островки Лангерганса, представляющие эндокринный компонент поджелудочной железы, имеют два основных типа клеток: А и В. Эти клетки различаются не

только морфологически, но и цитофизиологически. А. Лазаров и И. Куперштейн [5] с помощью аллоксана вызывали избирательное разрушение В-клеток. При этом у рыб развивался диабет. Этим способом установлено, что В-клетки рыб синтезируют инсулин. Увеличение инсулина в крови всегда коррелирует с увеличением количества В-клеток. А-клетки вырабатывают глюкагон.

Объектами настоящего исследования являлись сеголетки карпа (*Cyprinus caprio L.*) чешуйчатой и зеркальной групп. Рыбы содержались в аквариальных условиях при температуре +14-16°C. Кормление осуществлялось личинками хирономид и комбикормом craft soft light (тонищий) для карпа в дозе 1-2% от массы тела. Экспериментальным рыбам внутрибрюшинно вводили аллоксан в дозах 50, 100, 150, 200 и 300 мг/кг.

Результаты показали, что введение аллоксана вызывало изменения уровня глюкозы в крови рыб (рис. 1-3). Прослеживается следующая закономерность:

независимо от дозы препарата происходило увеличение содержания глюкозы в крови карпов, в среднем, на 7-14-й день после введения.



Рис. 1, 2. Динамика уровня глюкозы в крови сеголетков чешуйчатого карпа под действием аллоксана в разных дозах.

Затем, по мере адаптации, уровень глюкозы периферической крови либо остается на прежнем уровне, либо снижается. Эти изменения происходят скачкообразно, с интервалом в 3-10 дней.

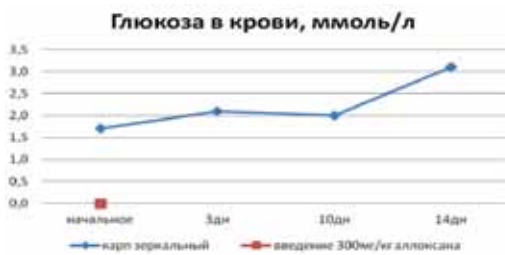


Рис. 3. Изменение уровня глюкозы в крови сеголетков зеркального карпа под действием аллоксана.

На всем протяжении эксперимента (53 дня) гибели исследуемых сеголетков карпа не наблюдалось, исключение составила одна особь чешуйчатого карпа (гибель наступила на 3-й день после внутрибрюшинного введения аллоксана в дозе 200 мг/кг).

Гистологические исследования показали разрушение структуры островков Лангерганса (рис. 4).

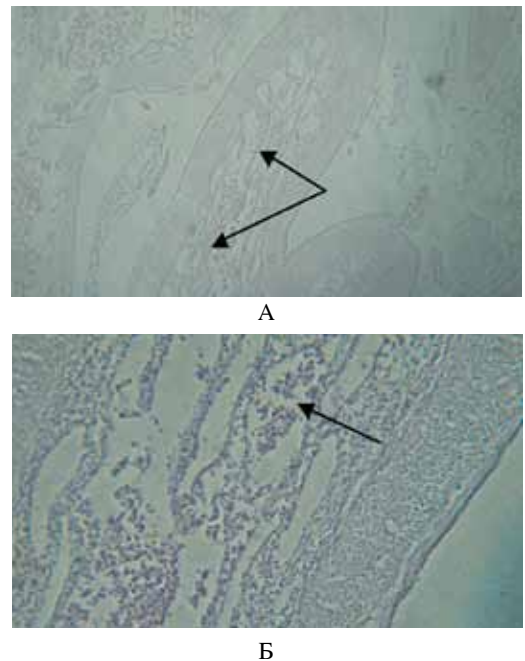


Рис. 4. Поджелудочная железа карпа под действием аллоксана. Атрофия островков Лангерганса. Окраска гематоксилин-эозином. А – Увеличение 10×10; Б – Увеличение 10×40.

Таким образом, введение аллоксана вызывает патологические изменения поджелудочной железы сеголетков карпа, выражающиеся в нарушении структуры островков Лангерганса и функции выработки инсулина.

Список литературы

1. Адо А.Д. Патологическая физиология (Ред.). М.: Триада-Х. 2000. 574 с.

2. *Крыжановский Г.Н.* Современная патофизиология как экспериментальная, фундаментальная и интегративная медико-биологическая наука // Вест. Рос. АМН. 1997. № 5. С. 60-62.
3. *Bormann I.* In Bolk: Hand der vergleichenden Anatomie der Wirbeltier 3, 1937.
4. *Laguesse E.* Structure du pancreas introhepatique cher les poissons // C. R. Acad., 1891. С. 112, 440.
5. *Lazarow A., Cooperstein J.* Studies on the isolated islet tissue of fish // Biol. Bull. 1951. Vol 100. No 3. P. 191-198.

Modelling of pancreas pathology in fish

G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze, O.I. Stepanova, O.V. Baranova, Yu.B. Lvov

The peritoneum injection of alloxan in doses 50 to 300 mg/kg thresh to juvenile carp causes pancreas pathology. The content of glucose in blood increases in fish of experimental group, the structure of the islets of Langergans is broken.

Key words: pathology modeling, carp, pancreas, the islets of Langergans, alloxan (C₄H₂N₂O₄).

Защитные эффекты фармакологического прекондиционирования морфином на модели острого инфаркта миокарда у крыс CD

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

¹ – Пуцинский Государственный естественно-научный институт, Пуцино

² – Лаборатория биологических испытаний Филиала Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пуцино

Контактная информация: Шайхутдинова Эльвира Рауильевна, shai78@rambler.ru

Изучена эффективность фармакологического прекондиционирования морфином на модели острого инфаркта миокарда у крыс CD в сравнении с ишемическим прекондиционированием, а также влияние этих защитных механизмов на размер инфаркта в зависимости от длительности тестовой ишемии.

Ключевые слова: острый инфаркт миокарда, морфин, ишемическое и фармакологическое прекондиционирование, крысы CD.

В 1986 г. С.Е. Мугу с соавт. обнаружили кардиопротективный феномен, названный ишемическим preconditionированием (ИПК). Суть его заключается в том, что после серии кратковременных периодов ишемии сердце приобретает повышенную устойчивость к повреждающему действию длительного нарушения коронарного кровотока, что проявляется в уменьшении объема зоны некроза. В последующие годы было выяснено, что иницирование адаптационных механизмов ИПК возможно с помощью правильно подобранных фармакологических подходов, имитирующих защитные эффекты preconditionирования миокарда без использования ишемических стимулов. Так, морфин может мимикрировать защитный эффект ИПК [9]. В 1996 г. было показано, что и ИПК, и фармакологическое preconditionирование морфином повышает устойчивость сердца к повреждающему действию длительного нарушения коронарного кровотока [3, 7, 8].

Также большой теоретический и практический интерес представляет исследование противоишемической эффективности preconditionирования в зависимости от длительности тестовой ишемии [6]. Для этого были выполнены эксперименты, в которых инфаркт-лимитирующий эффект ишемического и фармакологического preconditionирования морфином изучался при продолжительностях последующей ишемии 25 и 40 мин.

В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение защитных эффектов фармакологического preconditionирования морфином на модели острого инфаркта миокарда у крыс CD в сравнении с ишемическим preconditionированием, а также эффективности этих механизмов в зависимости от длительности тестовой ишемии.

Материалы и методы

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

На аутбредных самцах крыс Sprague-Dawley (300-350 г) под уретановым наркозом (1,5 г/кг, внутривенно) моделировали острый инфаркт миокарда окклюзией левой коронарной артерии (ЛКА) с последующей реперфузией, при искусственной вентиляции легких с частотой дыхания 60-65 в мин и дыхательным объемом 10 мл на 1 кг массы тела (Rodent Ventilator UGO BASILE 7025). Среднее артериальное давление (СрАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) в течение эксперимента измеряли электроманометром через катетер, введенный в бедренную артерию. Регистрация и обработка сигнала производилась с помощью программного обеспечения «NemoDynamics» версия 1.1. (ИБК РАН, Россия). Введения веществ осуществляли через катетер, имплантированный в бедренную вену.

Для оценки защитных свойств морфина в сравнении с ишемическим preconditionированием животных подвергали 25-мин окклюзии ЛКА с последующей 2-час реперфузией. За 30 мин до окклюзии крысы получали три 5-мин инфузии морфина (20 мкг/кг/мин), разделенные 5-мин периодами (группа ФПК-«фармакологическое preconditionирование»), или три 5-мин коронароокклюзии, разделенные меж-

ду собой 5-мин эпизодами реперфузии (группа ИПК — «ишемическое прекондиционирование»). Контролем служили животные, у которых моделировали окклюзию-реперфузию без дополнительных вмешательств.

При исследовании эффективности фармакологического и ишемического прекондиционирования в зависимости от длительности тестовой ишемии использовали те же схемы экспериментов, но окклюзия ЛКА длилась 40 мин. Каждая экспериментальная группа включала 8 животных.

Определение размеров анатомической зоны риска и зоны инфаркта производили с помощью методики «двойного окрашивания» 2% метиленовым синим и 1% трифенилтетразолием хлоридом (ТТХ). После окончания реперфузии вокруг коронарной артерии вновь затягивали лигатуру и внутривенно вводили раствор метиленового синего до визуализации границы между кровоснабжаемыми и ишемизированными отделами. Далее сердце быстро удаляли, отмывали в физиологическом растворе и разрезали в поперечном направлении на пять срезов одинаковой толщины. Полученные срезы инкубировали в течение 15 мин в растворе

ТТХ при температуре 37°C и рН 7,4, затем фиксировали 5 мин в 10% формалине. После этого изображения базальных поверхностей срезов фотографировали цифровой камерой SONY DXC-107AP, соединенной с фотографическим устройством микроскопа OLYMPUS SZ40. Компьютерную обработку изображений осуществляли с использованием программы *Image TOOL*. Общую площадь инфаркта вычисляли по пяти срезам и представляли в процентном отношении от площади зоны риска. Затем таким же способом как и в случае зоны инфаркта вычисляли площадь анатомической зоны риска от общей площади левого желудочка для данного сердца.

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

Результаты и их обсуждение

Показатели системной гемодинамики, а именно СрАД и ЧСС животных во время проведения эксперимента представлены в табл. 1.

Таблица 1
Показатели системной гемодинамики в экспериментальных группах

Группы	СрАД, мм.рт.ст.			ЧСС, уд/мин		
	исходно	конец окклюзии	конец реперфузии	исходно	конец окклюзии	конец реперфузии
25 мин окклюзии ЛКА						
Контроль	84,3±4,2	64,5±5,8*	48,0±3,5*	291,8±11,5	364,9±19,0*	401,5±14,2*
ФПК	83,8±2,5	56,5±3,9*	56,3±6,8*	319,9±17,4	338,6±28,4	373,4±15,9*
ИПК	79,0±2,5	60,0±2,4*	52,8±6,8*	291,1±16,8	317,6±13,0	318,6±23,1 [#]

40 мин окклюзии ЛКА						
Контроль	77,3±3,5	58,6±3,6*	53,3±3,2*	296,1±11,2	415,3±28,9*	441,5±25,6*
ФПК	83,5±2,1	69,6±3,4*	70,3±3,5*, #	326,1±17,1	379,3±23,0	358,6±12,5#
ИПК	75,9±5,3	59,3±4,1*	60,1±4,4*, #	270,7±6,3	357,9±14,2*	368±10,0*, #

Примечание: исходно — после имплантации артериального катетера; конец окклюзии — 25-я или 40-я мин после окклюзии ЛКА; конец реперфузии — в конце эксперимента;

* — $P < 0,05$ относительно исходных данных, # — $P < 0,05$ — относительно контрольной группы.

Исходно эти параметры достоверно не различались во всех группах. При 25-мин окклюзии ЛКА во всех трех группах к концу окклюзии наблюдалась гипотензия, а рефлекторная тахикардия на снижение АД была обнаружена только в контрольной группе. К концу реперфузионного периода в контроле сохранялась гипотензия и тахикардия по сравнению с исходными значениями. В группе «фармакологическое прекондиционирование» (ФПК) к концу эксперимента АД оставалось сниженным и возрастала частота сердцебиений, в группе «ишемическое прекондиционирование» (ИПК) также наблюдалось гипотензия, ЧСС же оставалась на исходном уровне и статистически значимо отличалась от величин контрольной группы на 120-й мин реперфузии. При 40-мин окклюзии ЛКА среднее АД в группах снижалось к концу окклюзии и оставалось сниженным до конца эксперимента, у контрольных животных величи-

при этом возникала как в контроле, так и в группе «ИПК» на протяжении всего окклюзионно-реперфузионного периода, причем на 120-й мин реперфузии частота сердцебиений у контрольных животных была достоверно выше, чем в двух других группах. При фармакологическом прекондиционировании морфином повышение ЧСС было менее выражено во время эксперимента. То есть ишемическое и морфиновое прекондиционирование уменьшило частоту развития тахикардий в реперфузионный период и предотвратило снижение артериального давления по сравнению с контролем при 40-мин окклюзии ЛКА (табл. 1).

Определение анатомической зоны риска не выявило отличий в группах, ее размер составил с $33,0 \pm 1,7$ до $39,3 \pm 3,2\%$ от общей площади левого желудочка, что свидетельствует об одинаковом объеме миокарда, подвергшегося ишемии (табл. 2).

Таблица 2

Размер анатомической зоны риска, выраженный в процентах от общей поверхности левого желудочка

Группы	25 мин окклюзии ЛКА	40 мин окклюзии ЛКА
Контроль	35,0±2,6%	39,3±3,2%
ФПК	33,1±2,1%	36,6±1,9%
ИПК	36,3±2,8%	35,5±1,6%

на этого показателя в конце реперфузии была достоверно ниже, чем в группах с прекондиционированием. Тахикардия

В то же время, размер зоны инфаркта был различным в зависимости от условий эксперимента (рис., табл. 3). Так,

при 25-мин окклюзии ЛКА применение морфина в группе «ФПК» приводило к статистически достоверному снижению размера инфаркта до $33,3 \pm 2,7\%$ (относительно контроля $42,9 \pm 2,7\%$). Ишемическое прекондиционирование также оказывало инфаркт-лимитирующее действие и уменьшало зону инфаркта еще более эффективно ($14,1 \pm 4,1\%$, $P < 0,05$).

Исследование защитного действия прекондиционирования при более длительной 40-мин ишемии ЛКА выявило достоверное увеличение зоны инфаркта в сравнении с 25-мин окклюзией во всех экспериментальных группах. В контрольной группе размер инфаркта составил $55,2 \pm 2,5\%$ ($P < 0,05$ относительно 25-мин окклюзии ЛКА). В группе «ИПК» зона инфаркта достоверно

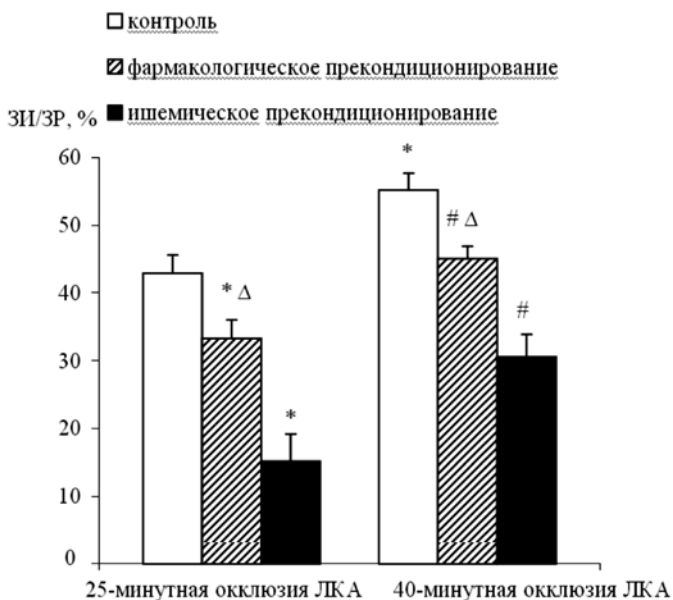


Рис. Защитные эффекты фармакологического и ишемического прекондиционирования при разной продолжительности окклюзии левой коронарной артерии (ЛКА). Зона инфаркта (ЗИ) выражена в процентах от зоны риска (ЗР).

* — $P < 0,05$ относительно контроля при 25-минут-ной окклюзии ЛКА;

— $P < 0,05$ относительно контроля при 40-минут-ной окклюзии ЛКА;

Δ — $P < 0,05$ относительно группы «ишемическое прекондиционирование».

Таблица 3

Данные для построения рисунка

Группы	Контроль		ИПК		ФПК	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
25-мин окклюзия ЛКА	42,9	2,7	14,1	4,1	33,3	2,7
40-мин окклюзия ЛКА	55,2	2,5	30,6	3,3	45,1	1,8

увеличивалась вдвое, с $14,1 \pm 4,1\%$ до $30,6 \pm 3,3\%$, защитный эффект прекондиционирования при этом сохранялся. Морфин также оказывал кардиопротективное действие, размер инфаркта составлял $45,1 \pm 1,8\%$ ($P < 0,05$ относительно контроля).

Сравнивая эффекты фармакологического и ишемического прекондиционирования при 25- и 40-мин окклюзии, можно заметить достоверную разницу в размерах инфаркта миокарда между этими группами. Эти результаты подтверждают, что опыты, выполненные с применением фармакологических агентов, нельзя считать воспроизведением классического феномена прерывистой ишемии, поскольку ишемическими стимулами мы воспроизводим именно ишемию клеток, а фармакологическими препаратами — лишь их гипоксию [2]. Возможно, при фармакологических подходах запускаются определенные пути защиты, действующие на эффекторы, которые активизируют внутриклеточные сигнальные процессы и приводят к изменениям в метаболизме, облегчающим выживание миоцитов в условиях длительной ишемии. Например, известно, что основные механизмы защиты миокарда с помощью морфина связаны с активацией АТФ-зависимых K^+ -каналов [4]. При ишемическом же прекондиционировании реализуются все возможные арсеналы, обеспечивающие толерантность сердца к ишемии — от изменения эффективности и скорости метаболических реакций, использующих АТФ, до образования целого ряда эндогенных триггеров, взаимодействующих с рецепторами кардиомиоцитов и далее активирующих разные пути проведения внутриклеточного сигнала,

в которых участвуют медиаторы и вторичные посредники ишемического прекондиционирования (е-изоформа протеинкиназы С и АТФ-зависимые K^+ -каналы), или прямо влияющих на активность ферментов [1]. Тем не менее, в литературе имеются сообщения о более эффективном кардиопротективном действии морфина. Так, в экспериментах Schultz с соавт. [7] было показано, что морфиновое прекондиционирование почти полностью воспроизводит эффект ишемического. Трудно сказать, в чем причина различий между результатами наших исследований и подобными данными. Возможно, это связано с использованием крыс разных линий, применением разных средств для наркоза [5].

Выводы

Таким образом, в результате наших исследований было показано, что фармакологическое прекондиционирование морфином оказывает инфаркт-лимитирующее действие как при 25-мин, так и при более длительной 40-мин окклюзии ЛКА, но защитный эффект морфина в схеме, идентичной ишемическому прекондиционированию, оказывается слабее.

Список литературы

1. Писаренко О.И. // Кардиология. 2005. №9. С. 62-72.
2. Сидоренко Г.И., Гурин А.В. // Кардиология. 1997. №10. С. 4-15.
3. Ela C., Barg J., Vogel Z., et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. 1997. V. 29. P. 711-720.
4. Fryer R.M., Hsu A.K., Nagase H., et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000. v. 294(2), P. 451-457.
5. Jugdutt B.I., Joljart M.J., Khan M.I. // Circulation. 1996. V. 94. P. 94-101.

6. *Riess M.L., Stowe D.F., Wartier D.C.* // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2003. V. 286. P. 1603-1607.
7. *Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J.* // Circ. Res. 1996. V. 78. P. 1100-1104.
8. *Schultz J.J., Hsu A.K., Gross G.J.* // J. Mol. Cell. Cardiol. 1997. V. 29. P. 2187-2195.
9. *Wang T.L., Chang H., Hung C.R., et al.* // Cardiovasc. Res. 1998. V. 40. P. 557-563.

Protective effect of pharmacological preconditioning by morphine on acute myocardial infarction in CD rats

E.R. Shaykhutdinova, O.N. Khokhlova, G.A. Slashcheva, A.N. Murashev

The peritoneum injection of alloxan in doses 50 to 300 mg/kg thres to juvenile carp causes pancreas patEfficiency pharmacological preconditioning with morphine on model of an acute myocardial infarction at CD rats in comparison with ischemic preconditioning and also influence of these protective mechanisms on the infarct size depending on duration of a test ischemia is studied.

Key words: morphine, ischemic and pharmacological preconditioning, CD rats.

Особенности авторегуляторных способностей управления альфа-ритмом художников и артистов, выявленные в биоуправляемом тренинге по стимулам визуальной и звуковой модальности

М.Ю. Ярец², Д.Б. Чайванов^{1,2}

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

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

В настоящей работе показано, что артисты, в отличие от художников, в значительно лучшей степени способны вызывать усиление и депрессию альфа-ритма в лобном отведении в процессе тренинга с биологической обратной связью (БОС) по стимулам визуальной и звуковой модальности. Вероятно, это объясняется тем, что артисты в своей профессиональной деятельности должны уметь управлять эмоциональным состоянием в соответствии с исполняемым ими произведением. Напротив, художники в своем творчестве обычно стремятся достичь наибольшей эмоциональной непосредственности. Таким образом, тренинг, направленный на развитие навыков самоуправления альфа-ритма, может быть полезен при профессиональном отборе и подготовке как артистов, так и лиц других специальностей, чьей профессиональной обязанностью является контроль над собственным психофункциональным состоянием.

Ключевые слова: биологическая обратная связь (БОС), произвольная саморегуляция, функциональное состояние, альфа-стимулирующий тренинг, ведущий канал восприятия информации.

Альфа-модулирующие БОС-тренинги, наряду с медициной, сегодня нашли применение в большом спорте, искусстве, а также в любой деятельности, требующей длительных усилий и большой ответственности. Важной сферой применения БОС-методов является педагогика, где с их помощью решаются вопросы повышения эффективности обучения, развития творческих способностей и др. [1].

Особый интерес в 70-е гг. представляло исследование с помощью БОС биоритмов мозга, а именно альфа-ритма — в особенности, в связи с вошедшими тогда в моду восточными практиками, такими как йога, медитация, аутогенная тренировка, релаксация, а также гипноз. Ранние работы, посвященные исследованию альфа-

ритма, связывали изменения в ЭЭГ с различными состояниями сознания [2, 3].

Биологическая обратная связь по альфа-волнам изучалась в качестве сопутствующей терапии при лечении алкоголизма [4, 5]. Было предложено обучение биологической обратной связи как способ научить алкоголиков расслабиться в качестве альтернативы алкоголю. Несколько работ, посвященных альфа-БОС в лечении алкоголизма [4, 6], показывают, что альфа-обучение уменьшает хроническое беспокойство и обладает некоторым долгосрочным терапевтическим эффектом относительно уровня тревожности.

Таким образом, биологическая обратная связь способствует улучшению произвольной саморегуляции, предостав-

ляя пациенту возможность управлять уровнем активации собственных регуляторных систем, способствует активации скрытых резервов организма, в результате чего улучшается его адаптивность, устойчивость к ряду соматических и психосоматических заболеваний.

Цель исследования. Сравнить способности художников и артистов в управлении альфа-ритмом в процессе альфа-модулирующих БОС-тренингов. Разработать технологию профессионального отбора и подготовки артистов и представителей других специальностей, которые, в силу своей профессиональной деятельности, должны эффективно управлять собственным психофункциональным состоянием (спортсмены, военнослужащие, сотрудники спецслужб и т.д.).

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 25 девушек в возрасте от 19 до 23 лет, студентки высших художественных и музыкальных учреждений (Московская Консерватория им. П.И. Чайковского, МГУПИ им. С.Г. Строганова, МГУП им. И. Федорова) 14 художников и 11 артистов (исполнителей классической музыки).

Исследование проводили с использованием программно-аппаратного комплекса БОС «РЕАКОР». Показания ЭЭГ снимались с лобных, центральных, теменных и затылочных электродов. В ходе анализа ЭЭГ оценивали средний индекс мощности альфа-ритма (диапазон 8-13 Гц) со всех отведений. Визуальная обратная связь подавалась через экран монитора, для аудиальной обратной связи использовали наушники.

Участницам эксперимента объясняли, что они не должны закрывать глаза в ходе эксперимента, т.к. это может привести к увеличению амплитуды альфа-ритма

(преимущественно, в затылочном отведении). Такое повышение амплитуды не будет связано с процессами, изучаемыми в эксперименте. Затем, после повышающей мотивацию инструкции, в которой кратко пояснялись все этапы тренинга БОС, а также задачи работы респондентов, каждая испытуемая участвовала в альфа-стимулирующем тренинге, специально созданном для данного эксперимента (25 мин).

Предъявляемый альфа-стимулирующий тренинг состоял из следующих этапов:

Первый этап — «исходный фон» (измеряли вклад альфа-ритма в состоянии покоя). На мониторе перед испытуемыми — слайды с фотографиями природного ландшафта.

Второй этап — «пробный» (задача испытуемых — произвольно изменять свое функциональное состояние, добиваясь реакций релаксации и эмоционального напряжения попеременно и сравнивая свои субъективные ощущения с показателями альфа-ритма на экране). На мониторе — график, отражающий суммарную выраженность альфа-ритма.

Третий этап — «отдых» (испытуемые не выполняют никакого задания). На мониторе — слайды с фотографиями природного ландшафта (закаты солнца).

Четвертый этап — «релаксация со зрительной обратной связью» (задача испытуемых — произвольная релаксация с помощью зрительной обратной связи (картинка бабочки), необходимо добиться отсутствия шумовых пятен в изображении). На экране монитора — фото голубой бабочки. При снижении вклада альфа-ритма в регуляцию ниже допустимого порога на фото появляются розовые пятна.

Пятый этап — «отдых». На мониторе — видеоролик (горы).

Шестой этап — «эмоциональное напряжение со зрительной обратной связью» (задача испытуемых — произвольное эмоциональное напряжение с помощью зрительной обратной связи (картинка розы), необходимо добиться отсутствия шумовых пятен в изображении).

На мониторе — фото розы. При увеличении вклада альфа-ритма в регуляцию выше допустимого порога на фото становится все более мозаичным.

Седьмой этап — «отдых». На мониторе — слайды с фотографиями водоемов (море).

Восьмой этап — «релаксация с аудиальной обратной связью» (задача испытуемых — произвольная релаксация с помощью аудиальной обратной связи через наушники (композиция «Silent night», альбом «Peace of Earth», исполнитель Kitaro), необходимо добиться отсутствия шумов мелодии). На мониторе — фоновый рисунок рабочего стола компьютера. В наушниках — музыкальная композиция. При понижении вклада альфа-ритма в регуляцию ниже допустимого порога в мелодии появляются шумы.

Девятый этап — «отдых». На мониторе — слайды с фотографиями водоемов (водопады).

Десятый этап — «эмоциональное напряжение аудиальной обратной связью» (задача испытуемых — произвольное эмоциональное напряжение с помощью аудиальной обратной связи через наушники (композиция из альбома Infinity, исполнитель ERA), необходимо добиться отсутствия шумов мелодии). На мониторе — фоновый рисунок рабочего стола компьютера. В наушниках — музыкальная композиция. При увеличении вклада альфа-ритма в регуляцию выше допустимого порога в мелодии появляются шумы.

Одиннадцатый этап — «итоговый фон» (измеряли вклад альфа-ритма в состоянии покоя). На мониторе — фото природного ландшафта.

Перед каждым этапом тренинга на экране монитора появлялась письменная инструкция. Для исключения эффекта прогрессии были созданы 4 варианта тренинга (менялись местами этапы на релаксацию и эмоциональное напряжение, типы обратной связи). Испытуемых распределяли по разным вариантам тренинга с помощью процедуры блочной рандомизации. Успешность выполнения задания на произвольную саморегуляцию функционального состояния зависела от преодоления пороговых значений альфа-ритма, которые выставлялись автоматически для каждой испытуемой в отдельности. В зависимости от типа задания (увеличить вклад альфа-ритма по сравнению с исходным значением (релаксация) или, напротив, снизить его (эмоциональное напряжение), порог успешности представлял собой среднее квадратичное отклонение от значения среднего индекса мощности альфа-ритма на этапе «исходный фон». Процедура исследования позволяет выявить особенности произвольной саморегуляции (релаксации и эмоционального напряжения) с помощью визуальной и аудиальной биологической обратной связи в зависимости от физиологических особенностей испытуемых, которые, в т.ч., связаны с их профессиональной деятельностью (ведущий канал восприятия — зрительный и акустический).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета программ STATISTICA 8.0. Различия между группами оценивали при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни для зависимых и независимых выборок.

Результаты и их обсуждение

В затылочном и центральном отведениях значимых корреляций между стадией эксперимента и амплитудой альфа-ритма обнаружено не было. Отсутствие корреляции в затылочном отведении свидетельствует о том, что испытуемые не закрывали глаза в ходе эксперимента, и о том, что переключение внимания со зрительного на звуковой стимул не приводило к ослаблению возбуждения зрительного канала восприятия настолько, что его можно было бы приравнять к закрытию глаз. Отсутствие значимых корреляций амплитуды альфа-ритма с этапом тренинга в центральном отведении свидетельствует о незначимом изменении напряжения мускулатуры в ходе исследования и незначимом изменении активно-

ритма в регуляцию (рис. 1). В этом же отведении вклад альфа-ритма на этапе «релаксация с аудиальной обратной связью» в сравнении с этапом «исходный фон» значимо выше. Обнаружены также достоверные различия между этапами «релаксация со зрительной обратной связью» и «релаксация с аудиальной обратной связью» в обозначенном ранее отведении. В последнем вклад альфа-ритма в регуляцию значимо выше.

Известно, что возбуждение и движение глаз уменьшают амплитуду альфа-ритма в теменном отведении, а торможение — напротив — увеличивает. При выполнении задания на релаксацию по зрительному образцу активация движения глаз вносит несколько больший вклад, чем собственно торможение. Это и при-

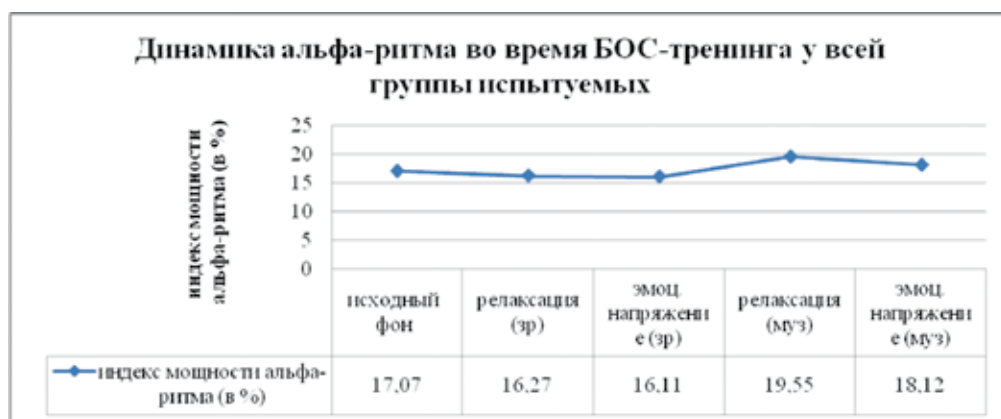


Рис. 1. Индекс мощности альфа-ритма на этапах тренинга у всей группы испытуемых в теменном отведении (индекс мощности альфа-ритма — отношение интеграла квадрата амплитуды ЭЭГ по частоте в диапазоне частот 8-13 Гц к интегралу квадрата амплитуды ЭЭГ по частоте в диапазоне частот 0,5-70 Гц, т.е. всей полосе записи ЭЭГ).

сти кинестетического восприятия. Таким образом, можно говорить о корректности постановки эксперимента.

В теменном отведении в сравнении с этапом «исходный фон» на этапе «эмоциональное напряжение со зрительной обратной связью» зафиксировано достоверное ($p < 0,05$) снижение вклада альфа-

водит к незначительному падению амплитуды альфа-ритма. В прочих этапах, как и следовало ожидать, релаксация приводит к увеличению амплитуды альфа-ритма; возбуждение, напротив, вызывает его уменьшение.

При анализе данных по группам (художники и артисты) была выявлена до-

стоверная ($p < 0,01$) разница во фронтальном отведении на этапе «релаксация со зрительной обратной связью»: у артистов вклад альфа-ритма в регуляцию на данном этапе значимо выше, чем у художников (рис. 2). Относительный прирост показателей индекса мощности альфа-ритма у артистов на данном этапе в сравнении с показателями этой группы на этапе «исходный фон» составляет +4,22. Художники демонстрируют относительное уменьшение данного показателя, составляющее -9,6.

На этапе «релаксация с аудиальной обратной связью» во фронтальном отведении артисты демонстрировали более высокую альфа-активность в сравнении с группой художников. Относительный прирост показателей индекса мощности альфа-ритма группы артистов на этом этапе в сравнении с этапом «исходный фон» составляет +3,71. Художники, напротив, демонстрируют относительное уменьшение данных показателей, которое составляет -12,3.

На этапе «эмоциональное напряжение с аудиальной обратной связью» у обеих групп снизился вклад альфа-ритма в регуляцию относительно этапа «исходный фон»: относительное снижение показателей индекса мощности альфа-ритма у художников составило -12,5, у артистов — -2,83. При этом обнаружены значимые различия в абсолютных значениях индекса мощности альфа-ритма: у артистов более высокая альфа-активность, чем у художников.

Полученные результаты свидетельствуют о лучшей саморегуляции артистов в сравнении с художниками, что, вероятнее всего, связано с образом жизни данной группы испытуемых (регулярные репетиции и концерты способствуют мобилизации артистов, усиленному контролю своего функционального состояния).

Выводы

1. Не обнаружены различия между выполнением БОС-тренинга с соответ-

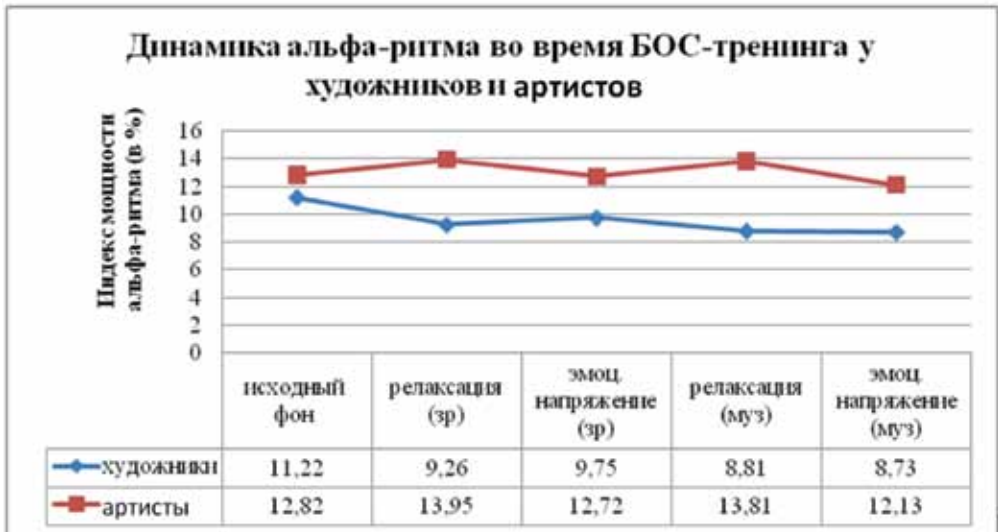


Рис. 2. Различия между группами по индексу мощности альфа-ритма на этапах тренинга во фронтальном отведении (индекс мощности альфа-ритма — отношение интеграла квадрата амплитуды ЭЭГ по частоте в диапазоне частот 8-13 Гц к интегралу квадрата амплитуды ЭЭГ по частоте в диапазоне частот 0,5-70 Гц, т.е. всей полосе записи ЭЭГ).

ствующим и не соответствующим ведущему каналу восприятия человека типом обратной связи (аудиальной у артистов, исполняющих музыкальные произведения, и зрительной – у художников).

2. Артисты демонстрируют лучшую произвольную саморегуляцию в сравнении с художниками, что может быть связано с большим количеством репетиций и выступлений, способствующих мобилизации и контролю текущего функционального состояния, а также с тем, что артисты в процессе выступлений вынуждены «подстраивать» свое психофункциональное состояние под воспроизводимую ими музыкальную композицию. Напротив, художники в процессе творчества не ограничены жесткими правилами, имеют большую возможность для творческой произвольной самореализации и, как следствие, у них нет необходимости целенаправленно управлять своим функциональным состоянием.

3. Таким образом, метод БОС может использоваться для диагностики и развития навыков произвольной саморегуляции функционального состояния, которые являются жизненно необходимыми в ряде профессий, поэтому данный метод должен учитываться при отборе и подго-

товке специалистов, задействованных в этих профессиях.

Список литературы

1. Общие вопросы применения метода БОС. Сб. статей. НОУ «Институт биологической обратной связи». - СПб.: ЗАО «Биосвязь». 2008.
2. *Kami J, Noles D.* The control of electroencephalographic alpha-rhythms through auditory feedback and associated mental activity // *Psychophysiology*. 1970. P. 6, 76.
3. *Basmajian J.V.* Biofeedback: Principles and Practice for Clinicians. Baltimore: Williams and Wilkins. 1989.
4. *Passini F.T., Watson C.B., Dehnel L., et al.* Alpha wave biofeedback training therapy in alcoholics // *Journal of clinical psychology*. 1977. 33. P. 292-299.
5. *Pollack V.E., Valavka J., Goodwin D.W., et al.* The EEG after alcohol in men at risk for alcoholism // *Archives of general psychiatry*. 1983. 40. P. 857-864.
6. *Watson C.G., Herder J., Passini F.T.* Alpha biofeedback therapy in alcoholics: An 8-month follow-up // *Journal of clinical psychology*. 1978. 34. P. 765-769.

Features autoregulatory abilities of alpha rhythm management of an artists and the actors, revealed in biocontrolled training on incentives of a visual and sound modality

M.Yu. Yarets, D.B. Chayvanov

In this paper we have showed that actors as opposed to artists can evoke an increase of the alpha rhythm in frontal lobe in the process of training with visual and sound stimulus much better. It can be explained probably because actors must control their emotions in compliance with drama they play, but artists in their work are usually trying to get maximum emotional directness. So training for ability of alpha rhythmic self-control may be useful in drafting and training actors and other specialists who need to control their psychofunctional condition during their work.

Key words: biofeedback, unrestricted self-regulation, functional condition, alpha stimulation training, main perceptive channel.

Психотропные эффекты эмоксипина в условиях иммобилизационного стресса

А.Л. Ясенявская^{1,2}, М.А. Самотруева^{1,2}, С.А. Лужнова²

¹ – ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Астрахань

² – ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России

Контактная информация: Ясенявская Анна Леонидовна, yasen_9@mail.ru

В данной работе было изучено влияние синтетического антиоксиданта эмоксипина на поведение крыс-самцов на разных этапах постнатального онтогенеза в условиях иммобилизационного стресса. Показана способность эмоксипина проявлять психомодулирующее действие, устраняя стресс-индуцированные депрессивноподобные нарушения в поведении животных.

Ключевые слова: иммобилизационный стресс, эмоксипин, поведение.

Стресс, несмотря на длительную историю изучения, продолжает оставаться актуальной проблемой. Большое внимание уделяется изучению факторов, вызывающих стресс, механизмам развития стресс-реакции и способам их устранения. Реакция на стресс включает не только ответ организма на физические или психологические потребности, но и более сложную интеллектуальную, эмоциональную и поведенческую реакцию [4]. Изучение организации простых и сложных форм поведения как компонентов стрессорного ответа особи остается приоритетным направлением современной физиологии. Поведенческая адаптация, являясь наиболее гибкой и разнообразной по форме, служит одним из механизмов предохранения организма от действия различных неблагоприятных факторов [6]. По мнению ряда исследователей, её элементы присутствуют на всех этапах адаптационного процесса [2, 4]. Однако формы и механизмы развития стресс-обусловленных поведенческих на-

рушений остаются не достаточно изученными. Антиоксидантная линия адаптации организма корригирует ход свободнорадикальных цепных реакций и мобилизацию антиоксидантных факторов для сохранения гомеостаза организма [3, 5]. Принимая во внимание тот факт, что при воздействии различных стрессогенных факторов наблюдается дестабилизация оксидантной системы организма, интерес при выборе стресс-протекторных средств представляют препараты, обладающие антиоксидантным действием.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилось изучение влияния синтетического антиоксиданта эмоксипина на поведение лабораторных животных, подверженных воздействию иммобилизационного стресса.

Материалы и методы

Исследование проведено на 80 белых беспородных самцах крыс, содержащихся в стандартных условиях вивария

при естественном освещении. Все животные были синхронизированы по питанию при свободном доступе к воде. Эксперимент проводили в 2 серии: в 1-ой изучали влияние эмоксипина на поведение молодых животных (1,5-2 мес., 75-120 г); во 2-ой — старых животных (20-24 мес., 260-350 г). В каждой серии животные были разделены на группы (n=10): 1-ю группу составляли контрольные крысы, получавшие в качестве «плацебо» эквивалентный объем дистиллированной воды; 2-ю группу — животные, получавшие ежедневно внутримышечно 1% раствор эмоксипина («Московский эндокринный завод») в дозе 5 мг/кг (14 дней); 3-ю группу — крысы, подвергнутые воздействию иммобилизационного стресса, вызванного путем ежедневного помещения особей в пластиковую камеру, ограничивающую их движения в течение 2 ч (экспериментальная гипокинезия) (14 дней); 4-ю группу — животные, получавшие 1% раствор эмоксипина («Московский эндокринный завод») в дозе 5 мг/кг внутримышечно и подвергавшиеся воздействию иммобилизационного стресса (14 дней). Психоэмоциональное состояние животных оценивали по результатам изучения поведения в тестах Порсолта и «Приподнятый крестообразный лабиринт» («ПКЛ»).

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакетов программ: Microsoft Office Excel 2007, BIOSTAT 2008 Professional 5.1.3.1.; с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони [1].

Результаты и их обсуждение

Результаты, полученные в ходе изучения психоэмоционального состояния молодых и старых животных, подверженных воздействию иммобилизацион-

ного стресса, свидетельствуют о формировании у крыс тревожно-депрессивных нарушений. Анализ поведения молодых и старых особей в тесте Порсолта показал, что при иммобилизационном стрессе происходит увеличение латентного периода (ЛП) до первого движения на 30% ($p<0,05$) у молодых и на 90% ($p<0,01$) у старых животных. ЛП до первого проявления иммобильности уменьшился у молодых особей на 30% ($p<0,01$), у старых — на 44% ($p<0,001$). Продолжительность иммобильности увеличилась в обеих группах: у молодых — на 76% ($p<0,001$), у старых крыс-самцов — в 3 раза ($p<0,001$) относительно контрольных показателей. Также в условиях экспериментальной гипокинезии в обеих возрастных группах отмечалось увеличение времени пассивного плавания, в среднем, на 80% ($p<0,01$ и $p<0,001$ у молодых и старых особей соответственно); тогда как время активного плавания, наоборот, сократилось, в среднем, на 20% ($p<0,05$) как у молодых, так и у старых животных (табл. 1).

Воздействие иммобилизационного стресса сопровождалось формированием состояния повышенной ситуативной тревожности, что проявлялось изменением поведения животных и в тесте «ПКЛ». Наблюдалось снижение как числа выходов в «открытые рукава» теста ($p<0,05$), так и продолжительности пребывания в них ($p<0,01$ и $p<0,05$ у молодых и старых особей соответственно). Длительность ЛП выхода в «открытые рукава» в обеих возрастных группах увеличилась на 25% ($p<0,05$). Кроме того, в обеих сериях у стрессированных животных наблюдалось уменьшение количества заходов в центральную зону, в среднем, на 25% ($p<0,05$ и $p<0,01$ у молодых и старых соответственно). На фоне стресса отме-

Влияние эмоксипина на поведение самцов крыс в тесте Порсолта в условиях иммобилизационного стресса

Экспериментальные группы (n = 10) Поведенческие показатели (M ± m)	Контроль	ИС	Э	Э + ИС
	молодые			
ЛП до 1-го движения, с	3,0 ± 0,3	3,9 ± 0,2*	2,8 ± 0,1	2,6 ± 0,1###
ЛП до 1-ой иммобильности, с	99,4 ± 6,3	69,8 ± 5,3**	102,6 ± 9,5	88,4 ± 7,6#
Иммобильность, с	11,9 ± 1,4	25,3 ± 2,5***	4,6 ± 1,3**	17,6 ± 2,3*#
Пассивное плавание, с	17,6 ± 1,4	37,4 ± 4,5**	8,0 ± 2,3**	18,9 ± 2,4##
Активное плавание, с	150,5 ± 9,4	117,3 ± 6,2*	167,4 ± 10,2	143,5 ± 8,9#
старые				
ЛП до 1-го движения, с	1,8 ± 0,1	3,4 ± 0,4**	1,6 ± 0,2	2,2 ± 0,1*##
ЛП до 1-ой иммобильности, с	138,8 ± 7,3	77,3 ± 5,4***	140,4 ± 9,1	100,6 ± 4,1****###
Иммобильность, с	8,4 ± 1,1	25,9 ± 3,1***	7,8 ± 1,4	19,3 ± 2,1***
Пассивное плавание, с	19,6 ± 2,1	35,8 ± 3,4**	14,6 ± 1,1*	19,1 ± 2,3##
Активное плавание, с	152,0 ± 8,6	118,4 ± 7,8*	157,6 ± 8,2	141,6 ± 8,6#

Примечание: :* — p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001 относительно контроля.

— p<0,05; ## — p<0,01; ### — p<0,001 относительно стресса (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони).

ИС — иммобилизационный стресс; Э — эмоксипин, ЛП — латентный период.

чалось также подавление исследовательской активности, что сопровождалось снижением числа стоек практически на 20% (p>0,05), количества «свешиваний» с «открытых рукавов» – на 75% (p<0,05 и p<0,01 у молодых и старых особей соответственно) и числа «выглядываний» из «закрытых рукавов» у молодых животных на 24% (p<0,05), а у старых – на 47% (p<0,01). Кроме того, в группе стрессированных животных отмечались вегетативные признаки повышенной тревожности в виде увеличения числа фекальных болюсов (p<0,01 и p<0,05 у молодых и старых самцов соответственно), интенсивности кратковременного груминга, в среднем, на 45% (p<0,001 и p<0,05 у молодых и старых особей соответственно), а также наличия у данной группы животных фризинга как у молодых (p<0,001), так и у старых крыс (p<0,05) (табл. 2).

При изучении влияния эмоксипина на поведение стрессированных животных обеих возрастных групп в тесте Порсолта выявлено снижение ЛП до первого проявления двигательной активности, в среднем, на 35% (p<0,001 и p<0,01 у молодых и старых животных соответственно), а также продолжительности периода иммобильности на 70% (p<0,05) у молодых и на 25% у старых особей (p>0,05). В условиях иммобилизационного стресса эмоксипин в обеих возрастных группах вызвал увеличение ЛП до первого эпизода иммобильности, в среднем, на 30% по сравнению с группой животных, подвергшихся стрессу (p<0,05 и p<0,001 у молодых и старых крыс соответственно). Кроме того, введение эмоксипина способствовало снижению продолжительности пассивного плавания, в среднем, на 50% (p<0,01) и увеличению активного

Влияние эмоксипина на поведение самцов крыс в тесте
«Приподнятый крестообразный лабиринт» в условиях иммобилизационного стресса

Экспериментальные группы (n = 10)	Контроль	ИС	Э	Э + ИС
Посещение «открытых рукавов»	0,1 ± 0,05	0*	0,4 ± 0,06**	0,5 ± 0,08***###
Время в открытом рукаве, с	1,4 ± 0,4	0**	4,1 ± 1,2*	10,0 ± 3,1*##
Посещение «закрытых рукавов»	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,09	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,1*##
Выходы в центр	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1*	1,6 ± 0,1*	2,0 ± 0,3*#
Время, проведенное в центре, с	19,1 ± 1,4	12,0 ± 1,2**	22,0 ± 2,1	16,4 ± 1,8#
Переходы через центр	0,3 ± 0,08	0**	0,6 ± 0,1*	1,0 ± 0,3*##
Вертикальная двигательная активность	8,4 ± 1,0	6,7 ± 1,2	10,4 ± 1,3	12,5 ± 1,6*#
«Свешивания» с «открытых рукавов»	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,09**	1,9 ± 0,7	1,8 ± 0,6*#
«Выглядывания» из «закрытых рукавов»	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1*	2,2 ± 0,2*	1,8 ± 0,2#
ЛП выхода в «открытые рукава», с	146,0 ± 7,3	180,0 ± 12,3*	135,9 ± 10,8	113,5 ± 9,8***###
Фекальные болюсы	0,6 ± 0,1	2,3 ± 0,5**	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2##
Кратковременный груминг	2,1 ± 0,1	3,1 ± 0,2***	1,8 ± 0,2	2,3 ± 0,1##
Фризинг, с	0	0,5 ± 0,1***	0	0,2 ± 0,09*#
старые				
Посещение «открытых рукавов»	0,5 ± 0,08	0,3 ± 0,05*	0,6 ± 0,07	0,5 ± 0,08#
Время в «открытом рукаве», с	4,7 ± 0,6	2,8 ± 0,7*	9,3 ± 1,4**	8,5 ± 1,6*##
Посещение «закрытых рукавов»	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1**	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,1#
Выходы в центр	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1**	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,1#
Время, проведенное в центре, с	9,7 ± 0,7	6,6 ± 0,9*	12,3 ± 1,0*	11,5 ± 0,9###
Переходы через центр	0,8 ± 0,09	0,3 ± 0,08**	1,1 ± 0,1*	0,8 ± 0,07###
Вертикальная двигательная активность	3,3 ± 0,5	2,8 ± 0,4	4,5 ± 0,3*	6,1 ± 1,1*#
«Свешивания» с «открытых рукавов»	1,7 ± 0,3	0,5 ± 0,2**	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,3##
«Выглядывания» из «закрытых рукавов»	1,7 ± 0,2	0,9 ± 0,08**	2,0 ± 0,2	1,6 ± 0,1###
ЛП выхода в «открытые рукава», с	4,7 ± 0,4	5,9 ± 0,4*	3,6 ± 0,3*	3,5 ± 0,4*##
Фекальные болюсы	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,2*	0***	0,1 ± 0,07***###
Кратковременный груминг	2,8 ± 0,5	4,0 ± 0,3*	1,1 ± 0,4*	2,6 ± 0,2##
Фризинг, с	0	1,0 ± 0,4*	0	0 #

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ относительно контроля.

— $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$; ### — $p < 0,001$ относительно стресса (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони).

ИС — иммобилизационный стресс; Э — эмоксипин, ЛП — латентный период.

плавания, в среднем, на 20% ($p < 0,05$) относительно стрессированных животных обоих возрастов, практически восстанавливая показатели до «нормы» в кон-

трольной группе ($p > 0,05$) (табл. 1).

Анализ поведения животных в «ПКЛ» показал, что на фоне введения эмоксипина стрессированным разновозрастным

крысам-самцам достоверно возросло как время нахождения в «открытых рукавах» ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ относительно контрольных значений и показателей стрессированных животных соответственно), так и число посещений «открытых рукавов» как у молодых ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ относительно контрольных значений и показателей стрессированных животных соответственно), так и у старых животных ($p > 0,05$ и $p < 0,05$ относительно контрольных значений и показателей стрессированных животных соответственно). В группе, подвергшейся воздействию иммобилизационного стресса и получавшей эмоксипин, отмечалось также снижение ЛП выхода в «открытые рукава» относительно стрессированных самцов, в среднем, на 40% ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ у молодых и старых особей соответственно) относительно интактных животных, в среднем, на 25% ($p < 0,05$). Кроме того, в данной группе животных выявлено увеличение количества выходов в центральную зону, в среднем, в 3 раза ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ у молодых и старых особей соответственно). Также введение эмоксипина на фоне стресса разновозрастным самцам способствовало достоверному повышению вертикальной двигательной активности как по отношению к контролю, так и к группе животных, подвергавшихся стрессу ($p < 0,05$). Количество «сवेशиваний» с «открытых рукавов» увеличилось у молодых в 4,5 раза ($p < 0,05$) относительно контроля и в 18 раз ($p < 0,05$) относительно стрессированных особей; у старых животных — в 3 раза ($p < 0,01$) относительно группы «стресс», приблизив значения к контрольным показателям. Возросло также число «выглядываний» из закрытых рукавов по сравнению со стрессированными особями на 40% ($p < 0,05$) и на 80% ($p < 0,001$) у молодых и

старых соответственно. В данных условиях отмечалось также статистически значимое уменьшение числа фекальных болюсов как у молодых ($p < 0,01$), так и у старых самцов ($p < 0,001$). Эмоксипин способствовал у разновозрастных животных, подвергшихся стрессу, снижению числа актов кратковременного груминга, в среднем, на 30% ($p < 0,01$) по сравнению с показателями при экспериментальной гипокинезии. Фризинг был зафиксирован только у молодых животных, но относительно стрессированных особей данный показатель был достоверно ниже ($p < 0,05$) (табл. 2).

Также нами была сформирована группа животных, получавших изучаемый антиоксидант при отсутствии стрессирующего воздействия. Оценивая влияние эмоксипина на поведение по показателям тестирования в тесте Порсолта у животных обоих возрастов, получавших эмоксипин, отмечена тенденция к снижению ЛП до первого движения, в среднем, на 10% ($p > 0,05$). ЛП до первой иммобильности как у молодых, так и у старых самцов оставался в пределах контрольных значений. Показатель иммобильности снизился на 60% ($p < 0,05$) у молодых животных, тогда как у старых — на 7% ($p > 0,05$). Длительность пассивного плавания под действием антиоксиданта снизилась у молодых на 55% ($p < 0,01$), у старых особей — на 26% ($p < 0,05$), тогда как продолжительность активного плавания у молодых крыс увеличилась на 10%, а у старых оставалась в пределах контрольных значений (табл. 1).

Изучая поведение животных в тесте «ПКЛ» было выявлено, что под воздействием эмоксипина происходит увеличение числа выходов в «открытые рукава» ($p < 0,05$ и $p > 0,05$ у молодых и старых животных соответственно) и времени пре-

бывания в них в 3 раза ($p < 0,05$) у молодых и в 2 раза ($p < 0,05$) у старых; также отмечалась тенденция к снижению длительности ЛП выхода в «открытые рукава» ($p > 0,05$ и $p < 0,05$ у молодых и старых животных соответственно). Кроме того, наблюдалось увеличение количества выходов в центральную зону, в среднем, на 20% ($p < 0,05$ и $p > 0,05$ у молодых и старых животных соответственно). На фоне введения эмоксипина отмечалась активация исследовательского поведения, что сопровождалось увеличением числа стоек на 25% у молодых ($p > 0,05$) и на 35% ($p < 0,05$) у старых животных, а также числа «выглядываний» из «закрытых рукавов» на 30% у молодых животных ($p < 0,05$) и на 20% у старых ($p > 0,05$). Количество «свешиваний» с «открытых рукавов» увеличилось лишь у молодых в 5 раз ($p < 0,05$), тогда как у старых крыс показатели остались в пределах контрольных значений. Кроме того, в группе животных, получавших изучаемый антиоксидант, выявлено уменьшение числа фекальных болюсов (у старых самцов показатель носил достоверный характер ($p < 0,001$)). В условиях воздействия эмоксипина отмечалась тенденция к снижению интенсивности кратковременного груминга ($p > 0,05$ и $p > 0,05$ у молодых и старых крыс соответственно) (табл. 2).

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о способности син-

тетического антиоксиданта эмоксипина оказывать психомодулирующее воздействие в условиях экспериментальной гипокинезии, устраняя депрессивноподобные нарушения в поведении животных.

Список литературы

1. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика М.: Практика. 1999. 459 с.
2. Калуев А.В. Принципы экспериментального моделирования тревожно-депрессивного патогенеза // *Нейронауки*. 2006. № 1. С. 46-56.
3. *Леонов А.Н.* Адаптационно-метаболическая теория гипербарической медицины // *Руководство по гипербарической медицине*. — М.: ОАО «Издательство Медицина». 2008. С. 40-69.
4. *Пиенникова М.Г.* Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2000. № 2. С. 24-31.
5. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. С. 89-90.
6. *Miguel Z. De., Vegas O., Garmendia L.* Behavioral coping strategies in response to social stress are associated with distinct neuroendocrine, monoaminergic and immune response profiles in mice // *Behav. brain res*. 2011. № 8. P. 12.

Psychotropic effects of emoxipine in the conditions of the immobilization stress

A.L. Yasenyavskaya, M.A. Samotrueva, S.A. Luzhnova

In this work we studied the effect of synthetic antioxidant emoxipine on the behavior of male rats at the different stages of postnatal ontogenesis in the condition of immobilization stress. Emoxipine is showed the psychomodulating action, eliminating the stress-induced depressive disorders in animal behavior.

Key words: immobilization stress, emoxipine, behavior.



Методические подходы к получению антивидовых антисывороток с целью их использования в иммунофармакологических исследованиях

А.Г. Берзина¹, Н.Б. Гамалея¹, Г.Д. Капанадзе²

¹ – ФГБУ «ННЦ Наркологии» Минздрава России

² – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

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

В статье рассматриваются методические подходы к получению антивидовых антисывороток. Предложены удобные схемы иммунизации различных лабораторных животных – кроликов, мини-свиней, крыс. Титры полученных антисывороток, определенные с помощью непрямого метода твердофазного иммуоферментного анализа, составили для кроличьих антисвиных сывороток 1 : 512000, для свиных антикроличьих – 1 : 256000, для крысиных антикроличьих – 1 : 128000 и крысиных антисвиных – 1 : 12800.

Ключевые слова: антивидовые сыворотки, иммуноглобулины класса G, кролики, мини-свиньи, крысы, иммунизация.

В настоящее время в нашей стране и за рубежом разрабатывается иммунологическая защита от целого ряда вредных химических соединений: канцерогенов, мутагенов, тератогенов и лекарств в случае их передозировки. В области наркологии работы ведутся для изучения возможности лечения отравлений наркотиками введением специфических антител, а также лечения и профилактики наркотической зависимости путем вакцинации специфическими антителами к наркотикам [3].

В доклинических иммунофармакологических исследованиях чаще всего в качестве продуцентов антител используют кроликов. При этом образуются поли-

клональные антитела различной специфичности. В последние годы стала широко применяться гибридная технология получения мышинных моноклональных антител.

Скрининг получаемых антител проводится, как правило, с помощью непрямого метода иммуоферментного анализа (ИФА) [2]. Успех тестирования зависит от качества используемых в анализе антивидовых сывороток, которые должны обладать высокими титрами и специфичностью.

Ввиду того, что в иммунофармакологической практике используются различные виды животных, актуальным является получение антивидовых анти-

сывороток к каждому виду животных, участвующих в эксперименте.

В 2011 г. в НИЦ наркологии совместно с НЦБМТ ФМБА России была начата работа по получению антител к психоактивным веществам. Целью настоящего исследования была разработка методических подходов к получению антивидовых антисывороток с высокими титрами и хорошей специфичностью.

Материалы и методы

Опыты проведены на 10 кроликах различных пород (серый великан, советская шиншилла, калифорнийская порода), 3 мини-свиньях светлогорской популяции и 20 крысах линии Wistar.

Нормативные ссылки

В наших исследованиях мы придерживались требований, утвержденных протоколами исследования, и стандартными операционными процедурами ФГБУН «НЦБМТ ФМБА России».

Данное исследование было выполнено в соответствии со следующими документами:

— Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»;

— Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. №708н "Об утверждении Правил лабораторной практики";

— Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [8];

— Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [9];

— Guide for the care and use of laboratory animals [10].

Распределение по группам

Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп отбор животных осуществлялся при помощи метода модифицированной блочной рандомизации. Для этого всех животных случайным образом помещали в ячейки блока рандомизации (число ячеек блока рандомизации кратно числу групп в эксперименте). Далее, пользуясь генератором случайных чисел (статистическая программа Statistica 6.0), получали перечень данных, содержащий номера ячеек с животными и соответствующие им номера групп, куда в дальнейшем были размещены животные.

Идентификация животных

Маркировка клетки кодировала пол животных, породу, дату начала эксперимента, название группы. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер. Мини-свиней маркировали бирками на ушной раковине, кроликов — с помощью ушных выщипов, мелких грызунов — с помощью меток на хвосте.

Содержание животных

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)».

В период акклиматизации и эксперимента животные были размещены в индивидуальных станках и в клетках в соответствии с требованиями GLP.

В качестве подстилки использовались стерилизованные опилки из хвойных пород деревьев.

Брикетируемые комбикорма для лабораторных животных давались ad

libitum в кормушки. Данные о составе и качестве корма от производителя хранятся в документации лаборатории.

Животным давалась очищенная вода ad libitum.

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (20-22°C и относительной влажности воздуха 50-70%). В помещениях для содержания животных поддерживался 12-час цикл освещения.

Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Никаких существенных отклонений этих параметров в период акклиматизации и в ходе эксперимента не произошло.

Клинические наблюдения

Клинический осмотр каждого животного проводили ежедневно. Выполняли тщательный осмотр животного в клетке содержания. Фиксировали общее состояние животных: особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координацию движений, тонус скелетных мышц, реакцию на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, органов чувств, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания и окраску мочи.

Подготовка антигенов для иммунизации

Поскольку при повторных иммунизациях основная масса продуцируемых антител принадлежит к классу иммуноглобулинов G, то в нашу задачу входило выделение из нормальных сывороток крови кроликов иммуноглобулинов G класса [1]. Выделение проводили с помощью метода ионообменной хромато-

графии на ДЭАЭ сефадексе А-50 известным способом [5]. Схемы очистки IgG из сывороток крови мини-свиньи и кролика представлены на рис. 1

На первом этапе к 6 мл сыворотки кролика добавляли равный объем 20% водного раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) мол. массой 6000 при помешивании в течение 15 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 1000g 20 мин. Преципитат растворяли в 3 мл 0,01 М калий-фосфатного буфера (КФБ), pH 7,4, содержащего 0,1 М натрия хлорида, и диализовали против того же буфера при +4°C в течение 18–20 ч. Колонку с ДЭАЭ-сефадексом А-50 (1,5 × 30 см) уравнивали стартовым калий-фосфатным буфером, pH 7,2. На колонку наносили 4 мл IgG после диализа с концентрацией 30 мг/мл. Первую фракцию IgG элюировали тем же буфером. Вторую фракцию элюировали градиентом 0,01–0,2М калий-фосфатного буфера (pH 8).

Из сыворотки крови свиньи выделяли иммуноглобулины класса G (IgG) методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-50 по методу Ключиной В.С. [6]. Для этого сначала выделяли суммарную фракцию иммуноглобулинов методом осаждения 20% водным раствором ПЭГ-6000. Для этого к 5 мл сыворотки медленно, при помешивании добавляли равный объем раствора ПЭГ-6000, встряхивали в течение 15 мин при комнатной температуре и центрифугировали полученную смесь при 1000g в течение 20 мин. Преципитат растворяли в 2,5 мл 0,01 М калий-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,1 М натрия хлорида, и диализовали против того же буфера при +4°C в течение 18–20 ч. Затем 2 мл полученного раствора IgG с концентрацией 50 мг/мл наносили на колонку с ДЭАЭ-

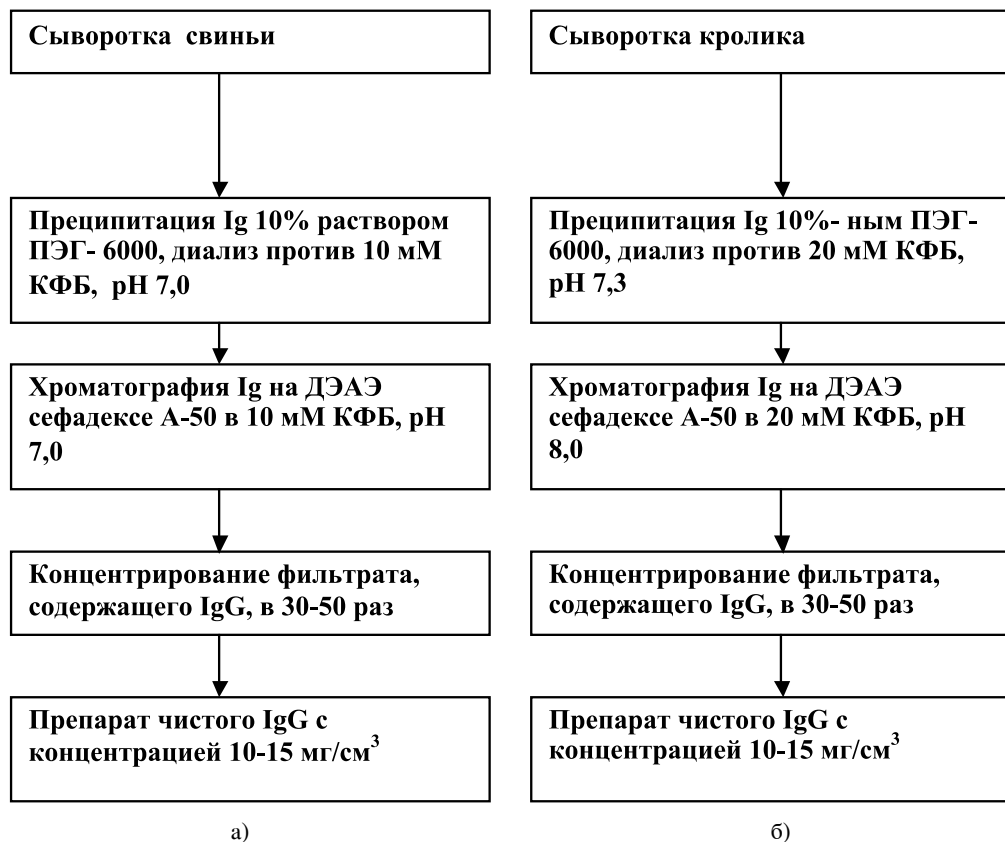


Рис. 1. Схема очистки IgG из сыворотки крови мини-свиньи (а) и кролика (б).

сефадексом А-50 (1,5 × 30 см), уравновешенную 0,02 М калий-фосфатным буфером, pH 7,0, и элюировали IgG тем же буфером.

Скорость элюции во всех экспериментах составляла 75 мл/ч. Объем фракций составлял 3 мл. Оптическую плотность фракций измеряли на спектрофотометре при длине волны 280 нм. Для определения концентрации полученного препарата IgG использовали коэффициент молярной экстинкции $\epsilon=1,2$. Отобранные фракции, содержащие IgG, объединяли и концентрировали в 3 раза с помощью концентраторов (Spin-X UF 6, Corning) и центрифугирования при 4000 г в течение 30 мин.

Выделенные антигены хранили при -20°C . Перед иммунизацией иммуногло-

булины растворяли в стерильном физиологическом растворе для внутривенных инъекций. Для подкожных и внутримышечных инъекций растворы антигенов смешивали с адьювантом Фрейнда (полным или неполным) в объемном соотношении 1 : 1.

Методики проведения инъекций животным

Кроликов иммунизировали внутривенно, вводя препарат в объеме 1,0 мл в краевую ушную вену. Подкожные инъекции осуществляли в 8 точек вдоль хребта с обеих сторон, вводя препарат в объеме 0,25 мл в каждую точку.

Внутривенные инъекции мини-свиньям проводили, вводя препарат в

объеме 2,0 мл в хвостовую вену. Подкожные инъекции осуществляли в область шейных лимфоузлов, вводя препарат в 2 точки в объеме 1,5 мл. Внутримышечные инъекции проводили в область задних конечностей, вводя препарат в 2 точки в объеме 1,5 мл.

Крысам вводили антиген подкожно в 4 точки вдоль хребта в объеме 0,25 мл или внутривенно в объеме 1,0 мл.

Забор крови у экспериментальных животных

Забор крови осуществляли у кроликов и свиней на 7-й, 14-й и 21-й день от последней инъекции. У крыс кровь забирала на 14-й день от последней инъекции.

Кровь забирала у кроликов из краевой ушной вены (10-20 мл), у свиньи — из хвостовой вены (20 мл), у крыс — после декапитации — 5-7 мл.

Техника проведения подкожных инъекций на мини-свинье показана на рис. 2.



Рис. 2. Техника проведения подкожных инъекций в область шейных лимфоузлов мини-свинье.

Техника забора крови у кролика представлена на рис 3.

Получение и хранение антисывороток

Полученную кровь инкубировали 1 ч при 37°C, далее выдерживали на холоде при +4 °С в течение 24 ч и отделяли образовавшуюся сыворотку центрифугированием при 3000 g. Сыворотки хранили при -20 °С в смеси с глицерином 1 : 1.

Тестирование антисывороток прямым методом ИФА

Определение титров полученных антисывороток проводили по стандартной методике непрямого варианта ИФА [2] с использованием полистирольных 96-луночных плоскодонных планшетов для ИФА фирмы Nunc (Дания), антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена, фирмы Sigma. Субстрат-хромогенная смесь состояла из перекиси водорода и ортофенилендиамина производства фирмы Sigma. За титр сыворотки принимали величину, обратную разведению



Рис. 3. Забор крови из краевой ушной вены кролика.

сыворотки, которое дает в ИФА значение оптической плотности (ОД), превышающее значение в контроле на 0,1 ед. оптической плотности (о.е.).

Результаты и их обсуждение

Гельхроматография суммарных фракций иммуноглобулинов, выделенных из нормальных сывороток лабораторных животных, позволила освободиться от других классов иммуноглобулинов и получить чистые препараты IgG.

На рис. 4 и 5 представлены элюционные профили очистки иммуноглобулинов кролика и свиньи методом ионной хроматографии на колонках с сефадексом ДЭАЭ А-50.

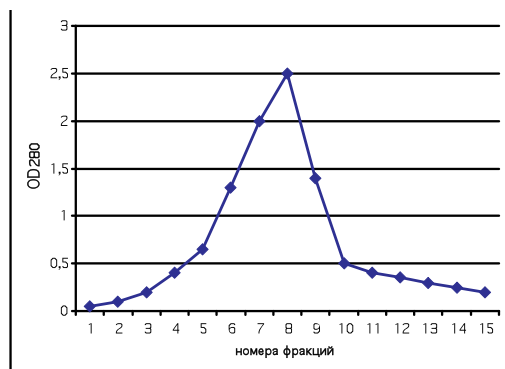


Рис. 4. Элюционный профиль очистки IgG кролика на сефадексе ДЭАЭ А-50.

Практический выход IgG в результате очистки сывороток кролика составил 60%, а сывороток мини-свиней — 20%.

Для получения антивидовых антисывороток нами были предложены следующие схемы иммунизации (табл. 1).

Результаты тестирования антисывороток на наличие антивидовых антител в ИФА представлены в табл. 2.

Тестирование антисывороток в ИФА после проведенного цикла иммунизации

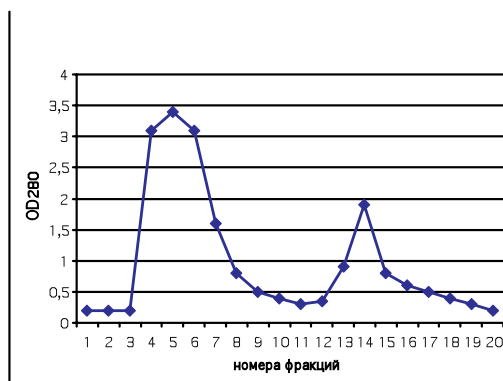


Рис. 5. Элюционный профиль очистки IgG свиньи на сефадексе ДЭАЭ А-50.

Таблица 1

Схема иммунизации лабораторных животных

Вид животных	Масса, кг	Вводимый антиген, вещество	Доза вводимого антигена, мг/кг	Способ введения антигена		
				1-я инъекция*	2-я инъекция*	3-я инъекция
Кролики калифорнийской породы	5	IgG свиньи	1	в/в	Подкожно, в 8 точек вдоль хребта, с ПАФ	Подкожно, в 8 точек вдоль хребта, с НАФ
Мини-свинья	9	IgG кролика	1	в/в	в/м, в 2 точки задних конечностей, с ПАФ	Подкожно, в 2 точки в область шейных лимфоузлов, с НАФ
Крысы линий Вистар	0,3	IgG свиньи, IgG кролика	1	Подкожно, в 4 точки вдоль хребта, с ПАФ	Подкожно, в 4 точки вдоль хребта, с НАФ	Внутрибрюшинно с НАФ

* Инъекции проводились с интервалом в 14 дней.

Сокращения: ПАФ – полный адъювант Фрейнда, НАФ – неполный адъювант Фрейнда.

Титры антивидовых антител в сыворотках иммунизированных животных, определенные
непрямым методом твердофазного ИФА

№ п/п	Сыворотка крови	Титр в ИФА	
		После первичной иммунизации	После реиммунизации
1.	Кроличья против IgG свиньи	1 : 128000	1 : 512000
2.	Свиная против IgG кролика	1 : 2000	1 : 256000
3.	Крысиная против IgG кролика против IgG свиньи	1 : 128000 1 : 12800	— —

кроликов иммуноглобулинами мини-свиньи показало, что наиболее высокие титры наблюдались при использовании кроликов калифорнийской породы, независимо от пола животного. Реиммунизация кроликов теми же антигенами позволила повысить титры антивидовых антител в 2 раза. При иммунизации мини-свиней иммуноглобулинами кролика наибольшие титры были получены только после реиммунизации, причем реиммунизация позволяла повысить титры более чем в 100 раз. Схемы иммунизации мини-свиней кроличьими иммуноглобулинами, предложенные другими авторами [4, 7], отличались большей трудоемкостью и позволяли получать сыворотки с меньшими титрами.

При обследовании сывороток иммунизированных крыс было отмечено, что титры антител против IgG кролика были в 10 раз выше, чем титры антител против IgG свиньи. По-видимому, это можно объяснить большей иммуногенностью IgG кролика, чем IgG свиньи, что объясняется серологическим родством иммуноглобулинов крысы и свиньи. Данный факт был отмечен в работе Клюкиной В.С. при тестировании антиглобулинового пероксидазного конъюгата свиньи с антителами крысы [6].

Выводы

Предложенная нами методика иммунизации животных позволяет получить антивидовые антисыворотки с высокими титрами, что говорит о ее преимуществах перед методиками, описанными другими авторами.

Удобство и простота исполнения данной методики делают ее полезной в иммунофармакологических исследованиях.

Полученные результаты могут представлять также интерес для исследователей в области биотехнологии и ветеринарии.

Список литературы

1. Антитела. Методы. Книга 1 / под ред. Д. Кэтти. М.: «Мир». 1991. 287 с.
2. Антитела. Методы. Книга 2 / под ред. Д. Кэтти. М.: «Мир». 1991. 382 с.
3. *Гамалея Н.Б., Берзина А.Г.* Вакцины от наркотиков — новое перспективное направление профилактики злоупотребления ПАВ // Журнал «Наркология». 2011. № 10. С. 70-83.
4. *Дибиров Ш.С.* Разработка и усовершенствование средств и методов диагностики чумы плотоядных животных. Автореф. дисс. канд. вет. Наук. Покров. 1997.
5. Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. М.: Изд-во «Мир». 1979. 267 с.

6. **Клюкина В.С.** Промышленные технологии производства тест-систем для диагностики инфекционных болезней свиней. Дисс. докт. биол. наук. Щелково. 2002.
7. **Хруленко В.Н.** Анализ эпизоотических и эпидемических процессов при туберкулезе и совершенствование методов диагностики. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Щелково. 2002.
8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ — 2-изд., перераб. и доп. — М.: ОАО Издательство «Медицина». 2005. 832 с.
9. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева. М.: Профиль — 2С. 2010. 358 с.
10. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. Washington. D.C. 1996.

Methodical approaches to production of antispecies antisera for immunopharmacological studies

A.G. Berzina, N.B. Gamaleya, G.D. Kapanadze

The paper describes the methodological approaches to production of antispecies antisera. Convenient patterns of immunization of different species of laboratory animals are proposed, i.e. rabbits, mini-pigs, and rats. The titers of antisera were determined by an indirect method of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). These titers were 1 : 512000 for the rabbit anti-pig antisera, 1 : 250000 for the pig anti-rabbit antisera, 1 : 128000 for the rat anti-rabbit antisera, and 1 : 12800 for the rat anti-pig antisera.

Key words: antispecies antisera, immunoglobulin G class, rabbits, mini-pigs, rats, immunization.



Исследование глутатиона как маркера второй фазы биотрансформации ксенобиотиков у детей с различной соматической патологией на фоне проводимого лечения

Б.И. Кантемирова¹, Д.А. Сычев², В.Н. Каркищенко³

¹ — ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России

² — ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им И.М. Сеченова» Минздрава России, г. Москва

³ — ФГБУН «НЦБМТ ФМБА», Московская область

Контактная информация: Кантемирова Бэла Исмаиловна, belakantemirova@rambler.ru

В повседневной жизни человек сталкивается с большим количеством ксенобиотиков, среди которых наиболее частыми для нас являются лекарственные препараты. Система биотрансформации ксенобиотиков позволяет при помощи реакций I и II фазы обеспечить метаболизм чужеродных веществ и их элиминацию. У детей процессы биотрансформации ксенобиотиков протекают менее активно, что обусловлено функциональной, физиологической незрелостью ферментных систем печени. В этой ситуации актуальным становится поиск неинвазивных, простых и доступных для широкого применения методов оценки детоксицирующей функции печени, например, таких как исследование активности глутатиона, входящего в состав глутатионтрансферазы.

Ключевые слова: ксенобиотики, система биотрансформации, глутатион, глутатионтрансфераза.

В окружающей среде современного человека ксенобиотики распространены повсеместно. В организм человека ксенобиотики попадают различными путями: через легкие при вдыхании ксенобиотиков, выбрасываемых промышленными предприятиями; через желудочно-кишечный тракт при употреблении воды и продуктов, содержащих чужеродные вещества; при контакте кожи с одеждой, содержащей красители и продукты химического синтеза [6, 8]. Самой распространенной группой ксе-

нобиотиков, пожалуй, являются фармакологические лекарственные препараты. На сегодняшний день известно более 17000 лекарств, многие из которых синтезированы в последние десятилетия [7].

Большинство ксенобиотиков в организме запускают образование свободных радикалов, которые могут повреждать мембраны клеток, утяжелять тем самым течение основного заболевания и быть причиной формирования нежелательных побочных реакций лекарственной терапии [4, 5].

Особое место среди ферментов, задействованных в обезвреживании ксенобиотиков, занимают глутатионтрансферазы (ГТ), принимающие участие в метаболизме тысяч ксенобиотиков, включая лекарственные препараты [1, 2, 3, 6, 8]. Глутатионтрансферазы функционируют во всех тканях и играют важную роль в инактивации собственных метаболитов: некоторых стероидных гормонов, простагландинов, билирубина, жёлчных кислот, продуктов ПОЛ. Система обезвреживания с участием ГТ и глутатиона играет уникальную роль в формировании резистентности организма к самым различным воздействиям и является наиболее важным защитным механизмом клетки [1, 6]. У детей, особенно раннего возраста, активность ферментов I и II фазы биотрансформации веществ может быть снижена ввиду функциональной, физиологической незрелости [5, 7, 9]. Поэтому изучение активности ферментных систем печени, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, в педиатрической практике имеет особую актуальность. Ряд веществ, в том числе и лекарств (например, тяжёлые металлы, полифенолы, S-алкилы глутатиона, некоторые гербициды), ингибируют глутатионтрансферазу.

Печень является главным органом метаболизма ксенобиотиков и подвержена их токсическому влиянию [6, 9]. Функциональной единицей печени является ацинус, состоящий из трех концентрических зон гепатоцитов, расположенных вокруг портальной триады (терминальная ветвь воротной вены, печеночная артериола и желчный проток) [8]. Гепатоциты 1 зоны, наиболее близкие к портальной триаде, являются самыми устойчивыми к повреждению. Гепатоциты зоны 3, наиболее отдаленные от портальной триады,

получают меньшие количества питательных веществ и особенно восприимчивы к ишемическому, токсическому и вирусному повреждению [8].

Таким образом, при назначении лекарственных препаратов, особенно в течение длительного времени, особую актуальность приобретают простые и доступные для широкого применения исследования, оценивающие активность системы глутатионтрансферазы и глутатиона, с разработкой мероприятий по повышению активности системы метаболизма ксенобиотиков, обеспечивающей элиминацию чужеродных веществ и защиту клеток печени от токсического воздействия.

Материалы и методы исследования

Титрование по Вудворту-Фрей (Удинцев Г.Н., Бланк В.Б., Кравец Д.А., Тимесков И.С., 1986). В качестве исследуемого материала использовалась венозная кровь 226 детей, больных различными соматическими заболеваниями и получающих стационарную помощь в условиях Городской детской клинической больницы № 2 г. Астрахани с 2003 по 2009 гг.

Пробу сразу гемолизировали. Для этого к 3 мл крови добавляли

24 мл дистиллированной воды. Через 5 мин прибавляли 3 мл 25% сульфосалициловой кислоты и фильтровали. Затем в фильтрат добавляли цинковой пыли на кончике ножа и через 30 мин вновь фильтровали. 10 мл фильтрата перенесли в чистую колбу и использовали для определения общего глутатиона. Затем в колбу прибавляли 2,5 мл 4% сульфосалициловой кислоты, 2,5 мл 5% йодистого калия, несколько капель крахмала и титровали 0,001 Н раствором йодноватокислого калия до появления слабого голубого окрашивания. Расчет: $G =$

($T \cdot 100$):3,26. Где G — количество глутатиона; T — количество мл 0,001 N раствора йодноватокислого калия, израсходованного на титрование; 3,26 — число, соответствующее количеству раствора йодноватокислого калия, идущего на титрование 1 мг глутатиона. Нормальные величины глутатиона — 1066 ± 30 мкМ/л.

Результаты и их обсуждение

Наименьшее содержание глутатиона в крови отмечалось у детей, страдающих эпилепсией (табл. 1).

повышении перекисного окисления липидов, во время патологических и воспалительных процессов, а также прямым участием глутатиона в конъюгации метаболитов вальпроатов, широко назначаемых для купирования судорожного синдрома.

При дальнейшем изучении наше предположение нашло свое отражение. Оказалось, что в зависимости от длительности непрерывной противоэпилептической терапии уровень восстановленного глутатиона был снижен по сравнению с

Таблица 1

Уровень глутатиона крови у детей с различной соматической патологией (мкМ/л)

Норма (мкМ/л)	Дети, страдающие эпилепсией (n=74)	Дети, страдающие атопическим дерматитом (n=53)	Дети, больные бронхиальной астмой (n=42)	Дети с внебольничной пневмонией (n=57)
1066 ± 30 мкМ/л	$540 \pm 97,6$ мкМ/л	$829,45 \pm 41,90$ мкМ/л	$736,37 \pm 57,6$ мкМ/л	$784,97 \pm 48$ мкМ/л

Полученные результаты можно объяснить вовлечением глутатиона в антиоксидантную защиту организма при

нормальными величинами со статистически достоверной разницей отличий в $p < 0,001$ (табл. 2). Степень снижения

Таблица 2

Содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови детей, больных эпилепсией, в зависимости от длительности проводимой противоэпилептической терапии

Норма (мкМ/л)	Длительность до 3-х лет (мкМ/л) (n=15)	Длительность до 5 лет (мкМ/л) (n=36)	Длительность свыше 10 лет (мкМ/л) (n=23)
1066 ± 30 мкМ/л	750 ± 64 $p_1 < 0,001$	620 ± 87 $p_2 - \text{НД}; p_3 < 0,001$	340 ± 90 $p_4 < 0,05; p_5 < 0,001$

Примечание: p_1 — достоверность различий между уровнем восстановленного глутатиона детей, больных эпилепсией и получающих непрерывную АЭТ до 3-х лет, и нормальными величинами восстановленного глутатиона; p_2 — достоверность различий между уровнем восстановленного глутатиона детей, больных эпилепсией и получающих непрерывную АЭТ до 3-х лет, и уровнем восстановленного глутатиона детей, больных эпилепсией и получающих непрерывную АЭТ до 5 лет; p_3 — достоверность различий между уровнем восстановленного глутатиона детей, больных эпилепсией и получающих непрерывную АЭТ до 5 лет, и нормальными величинами; p_4 — достоверность различий между уровнем восстановленного глутатиона детей, больных эпилепсией и получающих непрерывную АЭТ до 5 лет, и уровнем восстановленного глутатиона детей, больных эпилепсией и получающих непрерывную АЭТ свыше 10 лет; p_5 — достоверность различий между уровнем восстановленного глутатиона детей, больных эпилепсией и получающих непрерывную АЭТ свыше 10 лет.

зависела от «стажа противоэпилептической терапии» и вида медикаментозного воздействия: назначение препаратов в виде моно- или политерапии. В случаях применения комбинации противоэпилептических препаратов уровень восстановленного глутатиона был максимально снижен, что сопровождалось увеличением уровня печеночных трансаминаз.

вило различную степень активности восстановленного глутатиона крови на фоне неоднородной соматической патологии у детей, зависящую от вида и длительности проводимого лечения, что свидетельствует о необходимости разработки антиоксидантного и детоксицирующего «сопровождения» длительных схем фармакотерапии.

Таблица 3

Динамика количественного показателя восстановленного глутатиона крови у детей, получающих противоэпилептическую терапию, на фоне включения в схему терапии глицина в соответствующих возрастных дозировках

Уровень восстановленного глутатиона до включения в схему антиэпилептической терапии глицина (мкм/л), (n=32)	Уровень восстановленного глутатиона на фоне включения в схему антиэпилептической терапии глицина (мкм/л), (n=32)
570±81* (p<0,01)	890±94*

Примечание: * - p<0,01.

Снижение восстановленного глутатиона крови может ухудшать течение основного заболевания посредством уменьшения активности антиоксидантной системы организма ребенка, а также приводить к накоплению метаболитов лекарственных препаратов, что может способствовать проявлению нежелательных побочных эффектов.

Для повышения концентрации восстановленного глутатиона в плазме крови и усиления элиминации метаболитов противоэпилептических средств мы использовали глицин в соответствующей возрастной дозировке. Глицин непосредственно входит в состав глутатиона и является донатором цистеина для его синтеза [1]. Включение в схему противоэпилептической терапии глицина детям (n=32) позволило уже через 7-10 дней статистически достоверно (p<0,01) повысить уровень восстановленного глутатиона, при этом увеличения частоты приступов не отмечалось (табл. 3).

Проведенное нами исследование выя-

Выводы

Проведенное исследование показало информативность и чувствительность метода титрования при изучении концентрации глутатиона в крови у детей с различной соматической патологией, получающих различные группы лекарственных препаратов. Учитывая участие глутатионтрансферазы в конъюгации огромного количества ксенобиотиков, в том числе и лекарственных препаратов, простое в выполнении, экономически приемлемое, доступное для широкого применения, неинвазивное «in vitro» выполнение исследования по изучению уровня глутатиона крови может способствовать оценке активности II фазы детоксикации, что позволит вовремя осуществить мероприятия по активации антиоксидантной системы организма, повышению метаболической активности и защите клеток печени от неблагоприятного воздействия чужеродных веществ.

Список литературы

1. Биохимия. Уч. для вузов под ред. Е.С. Северина. — 2003. — Геотар Медиа. — С. 617-628.
2. Бушма М.И., Лукиенко П.И. Роль витаминов в функционировании монооксигеназ // Экспериментальная и клиническая фармакокинетика. — 1994. — № 5. — С. 53-57.
3. Переслегина И.А., Макарова И.Б., Назарова Е.В., Успенская И.Д., Хвостова Е.Б. Детоксицирующая система глутатиона при целиакии у детей // Эфферентная терапия. — 1998. — № 4. — С. 38-41.
4. Переслегина И.А., Габина С.В., Макарова И.Б., Жукова Е.А., Коркоташвили Л.В. Детоксицирующая функция печени по данным фармакокинетики антипирина при заболеваниях органов пищеварения у детей // Эфферентная терапия. — 2005. — № 2. — С. 14-17.
5. Зборовский А.Б., Тюренков И.Н., Чельцов В.В. Механизмы развития неблагоприятных побочных реакций лекарственных средств // Мат-лы семинара «Контроль безопасности лекарств». М., 1998. — С. 21-24.
6. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Обмен глутатиона // Успехи биологической химии. 1990. — Т. 31. — С. 157-179.
7. Побочные действия лекарственных средств / Под ред. М.Н.Г. Дюкса. — М: Медицина. — 1983. — 560 с.
8. Чиркин А.А. Молекулярные механизмы повреждения печени // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2000. — № 1.- С. 26-33.
9. Petronijevic M., Ilic K., Suzuki A. Drug induced hepatotoxicity: data from the Serbian pharmacovigilance database // Pharmacoepidemiol. Drug. Saf. — 2011. — Vol. 20(4). — P. 416–423.
10. Steinbrook R. Testing medications in children // N Eng J Med. 2002. — V. 347 — P. 18.

Investigation of glutathione as a marker of the second phase of the biotransformation of xenobiotics in children with various physical symptoms during the treatment

B.I. Kantemirova, D.A. Sychev, V.N. Karkischenko

In an everyday life people meet a large number of xenobiotics among which the most frequent for us are medicines. The system of biotransformation of xenobiotics allows by means of reactions of I and the II phase provide a metabolism of alien substances and their elimination. Bioprocesses of transformation of xenobiotics in children proceed less actively that is caused by functional, physiological immaturity of fermental systems of a liver. In this situation the search of noninvasive, simple and available to broad application methods of an assessment of detoxifying function of liver, for example, such as activity research glutathione, a part glutathionetransferase is actual.

Key words: xenobiotics, biotransformation system, glutathione, glutathionetransferase.



Лазерный спектрально-флуоресцентный кольпоскоп: доклиническая апробация на экспериментальной опухолевой модели

Н.Н. Булгакова¹, В.В. Смирнов¹, В.И. Фабелинский¹, А.Г.Федотов²,
Н. И. Казачкина³, Г.Д. Капанадзе⁴

¹ – Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

² – ООО «Инлайф», Москва

³ – Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва

⁴ – ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская область

Контактная информация: к.м.н. Голубев Сергей Владимирович, golubev@aetechnologies.ru

В данной работе представлены результаты доклинической апробации макета лазерного спектрально-флуоресцентного кольпоскопа (ЛСФК), разработанного для аутофлуоресцентной диагностики ранних форм рака шейки матки (РШМ). Оценка эндогенного (аутофлуоресцентного) и экзогенного флуоресцентного контраста на примере экспериментальной опухолевой модели показала, что выбранные и реализованные технические решения адекватны поставленной медицинской задаче, и, в тоже время, возможности созданного прибора существенно шире. Высокое качество регистрации флуоресцентных изображений и спектральных данных позволит использовать ЛСФК для целей флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии с экзогенными фотосенсибилизаторами из класса порфиринов и хлоринов.

Ключевые слова: рак шейки матки, аутофлуоресценция, флуоресцентная диагностика, кольпоскоп, фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия.

На протяжении последних лет наблюдается тревожная тенденция роста заболеваемости раком шейки матки (РШМ) среди молодых женщин в возрастной группе до 40 лет, т.е. в репродуктивно значимой и социально активной части населения. В настоящее время доказано, что более 99% случаев РШМ вызывается высокоонкогенными типами вируса папилломы человека (ВПЧ), распространенность которого в мире увеличилась более чем в 10 раз, причем основной кон-

тингент составляют женщины детородного возраста [8, 11].

Развитию рака шейки матки предшествуют различные стадии цервикальной интраэпителиальной неоплазии (СIN I, СIN II, СIN III), особенностью которых является отсутствие специфических визуально и пальпаторно выявляемых изменений [9, 10].

На первой стадии диспансеризации населения для выявления неоплазии применяется метод цитологического скри-

нинга, или ПАП-тест. Данный метод достаточно прост, однако обладает низкой специфичностью. Количество ложноположительных результатов варьирует, по данным разных авторов, от 15 до 40%. В случае подозрения на развитие CIN проводится кольпоскопическое исследование, предсказательная ценность которого весьма ограничена. Для окончательной диагностики CIN требуется выполнение биопсии шейки матки с последующим гистологическим исследованием. Для улучшения диагностической ценности кольпоскопического исследования и уменьшения количества необоснованных биопсий необходима разработка новых подходов к неинвазивной диагностике ранних форм РШМ [8].

В настоящее время в различных областях медицины и, в первую очередь, в онкологии, большое развитие получают методы диагностики, основанные на регистрации различий во флуоресцентном излучении патологических очагов и окружающих нормальных тканей, которые возникают при освещении поверхности ткани светом определенной длины волны УФ или видимого диапазонов спектра [15, 12]. Эти различия, для описания которых используется термин «флуоресцентный контраст», могут иметь эндогенное или экзогенное происхождение. В первом случае метод называется аутофлуоресцентной диагностикой (АФД). В его основе — различия в интенсивности и спектральном составе эндогенного (аутофлуоресцентного) излучения нормальных и патологических тканей. Как показано во многих клинических исследованиях, при возбуждении в УФ и синей области спектра интенсивность аутофлуоресцентного излучения в очагах рака намного меньше, чем в нормальных тканях (эффект «темного

пятна»). Во втором случае флуоресцентный контраст возникает в результате селективного окрашивания патологических очагов экзогенными красителями или флуоресцирующими маркерами. Прежде всего, к ним относятся фотосенсибилизаторы, которые применяются для фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических и неонкологических заболеваний. В результате избирательного накопления фотосенсибилизаторов, патологические очаги ярко флуоресцируют в красной области спектра (630-670 нм). Для описания этого метода применяется термин «фотодинамическая диагностика», или «фотодиагностика». Флуоресцентные методы диагностики ранних форм рака обладают крайне высокой чувствительностью, достигающей 90%, и существенно меньшей специфичностью [15, 12-14]. Поскольку глубина проникновения возбуждающего излучения крайне мала, они позволяют выявлять патологические очаги, расположенные только в поверхностных слоях кожи или слизистых оболочек полых органов. Источником диагностической информации является визуальная оценка флуоресцентных изображений либо количественный анализ спектров лазериндуцированной флуоресценции при измерениях *in vivo* в точке поверхности ткани (метод локальной флуоресцентной спектроскопии, ЛФС). При наблюдении флуоресцентных изображений подозрительные очаги выявляются по аномальной интенсивности флуоресценции на фоне флуоресцентного излучения здоровой ткани в зеленой области спектра. Верификация флуоресцентных изображений при проведении ЛФС повышает предсказательную ценность флуоресцентных методов диагностики [13, 14, 19].

Развитие методов флуоресцентной диагностики ранних форм РШМ сдерживалось ввиду отсутствия на рынке специальной кольпоскопической аппаратуры. Ранее нами были проведены исследования, направленные на разработку метода аутофлуоресцентной диагностики ранних форм РШМ [2, 4], и описан разрабатываемый лазерный спектрально-флуоресцентный кольпоскоп (ЛСФК), предназначенный для реализации данного метода [1, 3]. При его разработке предусматривалось выполнение следующих функций:

1. Обычная визуализации ШМ и, в том числе, патологических очагов при освещении ее поверхности сверхяркими светодиодами белого света с помощью высокочувствительной и высококачественной фото/видеокамеры. Наложение электронного зеленого фильтра на изображение предоставляет дополнительную возможность контрастирования сосудистой структуры.

2. Регистрация и анализ флуоресцентного изображения той же фото/видеокамерой. Одновременный качественный анализ сосудистой структуры, цветного и флуоресцентного изображений позволяет выявлять подозрительные участки.

3. Измерения спектров лазериндуцированной флуоресценции в локальной точке ткани при возбуждении на длине волны ~ 407 нм с помощью волоконно-оптического зонда, регистрация спектра в диапазоне 420-800 нм и его отображение на экране монитора компьютера в реальном времени.

В данной работе представлены результаты доклинической апробации ЛСФК на примере экспериментальной опухолевой модели. **Целью** работы была оценка возможностей разрабатываемого ЛСФК в регистрации как эндогенного (аутофлуо-

ресцентного), так и экзогенного флуоресцентного контраста опухоли-норма.

Материалы и методы

Состав прибора. Состав прибора и основные задачи, которые решались при его разработке, описаны ранее в работе [1]. Кратко необходимо отметить, что прибор состоял из видеокамеры с объективом с переменным фокусным расстоянием (zoom), источников белого и синего света, блока светофильтров, блока питания источников света, решеточного спектрометра, лазерного источника излучения с длиной волны ~ 407 нм, волоконно-оптического зонда.

Однако к настоящему моменту прибор претерпел заметное изменение. Вместо видеокамеры с матрицей 1360×1040 пикселей и zoom-объективом теперь устанавливается фотокамера Canon EOS550D с матрицей 5184×3456 пикселей и макрообъективом с фиксированным фокусным расстоянием 100 мм. Такое сочетание матрицы и объектива дает возможность получить настолько высококачественные изображения, позволяющие рассмотреть мельчайшие детали, что применение объективов с переменным фокусным расстоянием для последовательного детального изучения объекта теперь представляется излишним.

Используемая фотокамера способна постоянно выводить «живое» телевизионное изображение в формате HD видео, которое наблюдается врачом на экране монитора и обеспечивает возможность настройки положения и «прицеливание» головки кольпоскопа.

Проведенная модификация позволяет резко сократить время исследования, вследствие чего работа с данным прибором становится значительно более удобной для врача-кольпоскописта.

Прибор управляется компьютером со специально разработанным многофункциональным программным комплексом, который, в том числе, обеспечивает детальную визуализацию любых фрагментов изображения с помощью «электронного увеличения».

Регистрация цветного изображения осуществляется при освещении рабочего поля белыми сверхяркими светодиодами, в то время как для получения флуоресцентных изображений применяются синие светодиоды, обеспечивающие плотность мощности возбуждающего излучения на поверхности ткани 1-2 мВт/см². Для наблюдения флуоресцентных изображений перед объективом устанавливается светофильтр, отсекающий свет синих светодиодов и пропускающий излучение флуоресценции в диапазоне 420 — 800 нм.

ЛФС осуществляется решеточным спектрометром с интегрированным лазерным источником возбуждения флуоресценции, оптимизация длины волны которого была проведена ранее в работе [4]. Источник представляет собой лазерный диод с длиной волны 407±5 нм и волоконно-оптическим выходом. Для доставки возбуждающего излучения к исследуемой поверхности и сбора флуоресцентного излучения используется волоконно-оптический зонд длиной до двух метров. Максимальная мощность лазерного излучения на выходе зонда — 2 мВт.

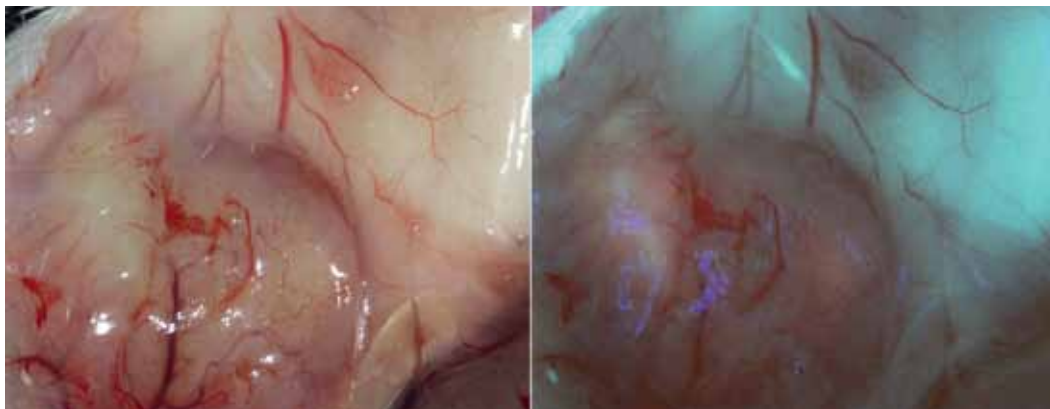
Опухолевая модель. В качестве экспериментальной опухолевой модели использовали аденокарциному толстой кишки мыши (Акато). В работе использовались мыши линии BALB/c, самцы, 18 г, разведения питомника РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Опухоль прививали подкожно в количестве 75 мг опухолевой ткани/мышь. Исследование проводили на 8-ой

день роста. Для получения изображений и измерения спектров животное умерщвляли дислокацией шейных позвонков и выделяли опухоль с участком кожи. Фотосенсибилизатор (хлорин еб) вводили внутривенно в дозе 2 мг/кг в.т. за 3 ч до проведения исследования.

Измерения спектров и фотосъемку проводили в затемненном помещении.

Результаты и их обсуждение

Изображения, полученные при освещении тканей белым (А) и синим (Б) светом (аутофлуоресценция), представлены на рис. 1. Прежде всего, следует отметить высокое качество изображений поверхности и сосудистой структуры тканей, а также ярковыраженный контраст между опухолью и окружающей нормальной тканью при освещении синим светом. Как можно видеть на рис. 1Б, подкожно-жировая клетчатка имеет однородное зеленоватое свечение. Свечение опухолевой ткани неоднородно и имеет красноватый оттенок, что позволяет определить четкие границы опухоли. Визуальный аутофлуоресцентный контраст подтверждается данными ЛФС. Как можно видеть на рис. 2, в спектрах, измеренных в нормальной ткани, присутствует широкая полоса излучения в области 450-750 нм с максимумом в зеленой области на 500 нм. Форма спектров аутофлуоресценции нормальной ткани имеет высокую воспроизводимость, ошибка измерений в локальной точке не превышает 3-5%. Спектры, измеренные в зоне опухоли, имеют ярковыраженные отличия. Прежде всего, следует отметить, что спектральная интенсивность аутофлуоресцентного излучения опухоли в диапазоне 420-600 нм значительно меньше, чем в нормальной ткани, причем в зеленой об-



А

Б

Рис. 1. Изображения опухоли на фоне окружающей нормальной ткани при освещении белым (А) и синим (Б) (аутофлуоресценция) светом.

ласти — почти на порядок (рис. 2). Во-вторых, в области 630-650 нм присутствует небольшой пик флуоресценции с максимумом на 635 нм, наличие которого объясняет красноватый оттенок аутофлуоресцентного излучения опухолевой ткани. Положение максимума на 635 нм свидетельствует о присутствии

в опухоли эндогенного протопорфирина 9. Действительно, эффект накопления эндогенных порфиринов может происходить в тканях злокачественной опухоли, имеющих высокую активность метаболизма и большую плотность микрососудов, как в стадии активного роста и васкуляризации, так и в результате

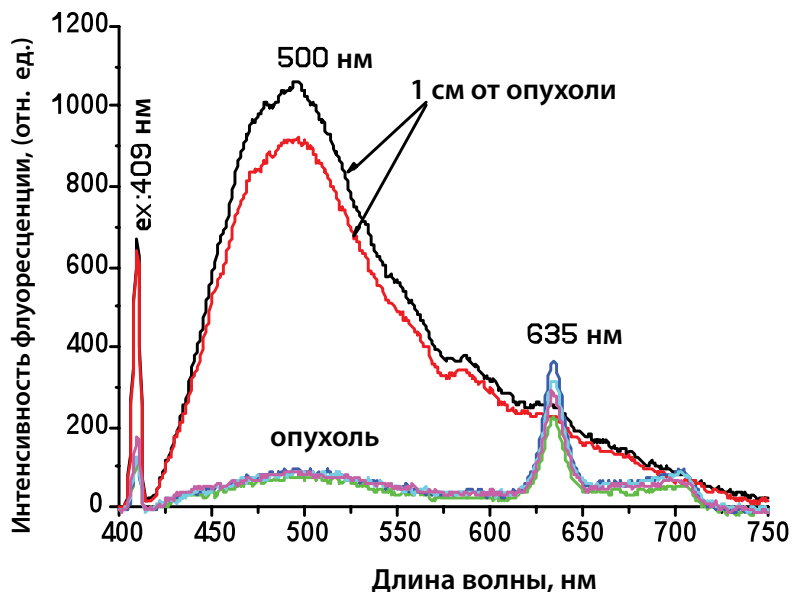


Рис. 2. Спектры лазер-индуцированной аутофлуоресценции, измеренные в зоне опухоли и в 1 см от опухоли.

возникновения в них очагов ишемии и некроза [12].

Изображения, полученные при освещении тканей белым (А) и синим (Б) светом после введения фотосенсибилизатора, представлены на рис. 3. Можно видеть, что разработанный макет ЛСФК позволяет с высокой точностью и качеством изображения регистрировать не только эндогенный, но и экзогенный контраст, обусловленный селективным накоплением в опухоли фотосенсибилизатора. Пораженный участок и его границы, за исключением зоны слева от опухоли, четко очерчены и визуализируются по яркой красной флуоресценции фотосенсибилизатора, при этом отчетливо виден сосудистый рисунок опухоли (рис. А и Б). Зеленое свечение окружающей нормальной ткани свидетельствует об отсутствии в ней фотосенсибилизатора.

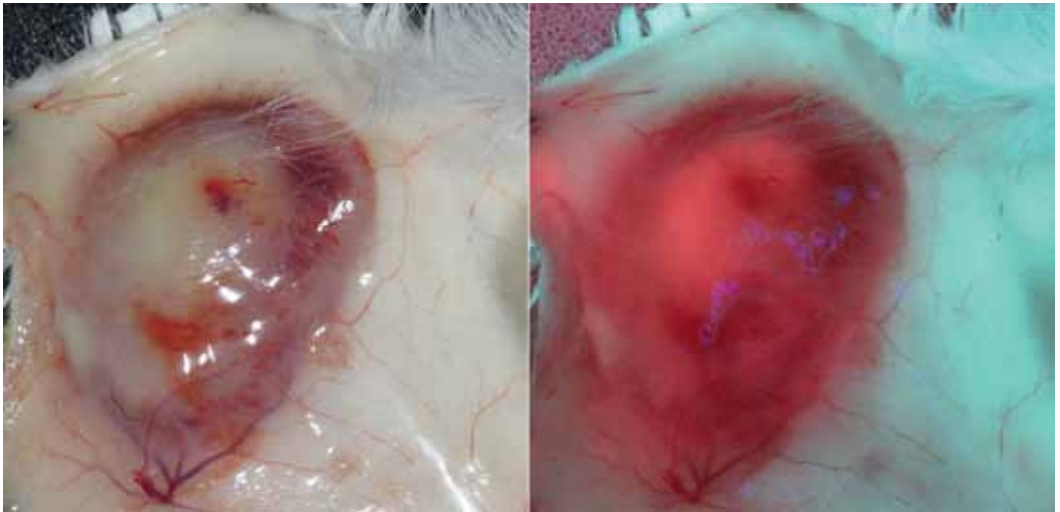
Данные ЛФС, представленные на рис. 4, также полностью подтверждают визуальные оценки. Можно видеть, что в спектрах, измеренных в зоне опухоли,

присутствует пик флуоресценции фотосенсибилизатора с максимумом 667 нм, интенсивность которого резко падает на границе опухоли.

Выводы

Проведенная доклиническая апробация созданного макета ЛСФК показала, что выбранные и реализованные технические решения адекватны поставленной медицинской задаче, в то же время, возможности созданного прибора существенно шире. Очевидно, что прибор может применяться не только для разработки метода АФД ранних форм РШМ. Высокое качество регистрации экзогенного флуоресцентного контраста опухоль-норма позволит использовать ЛСФК для целей флуоресцентной диагностики и ФДТ РШМ.

Метод ФДТ, клинический опыт применения которого в гинекологии обобщен в ряде обзоров, вызывает большой интерес гинекологов [17, 5]. Проведенные исследования выявили большой потенциал



А

Б

Рис. 3. Изображения опухоли на фоне окружающей нормальной ткани при освещении белым (А) и синим (Б) светом после введения фотосенсибилизатора.

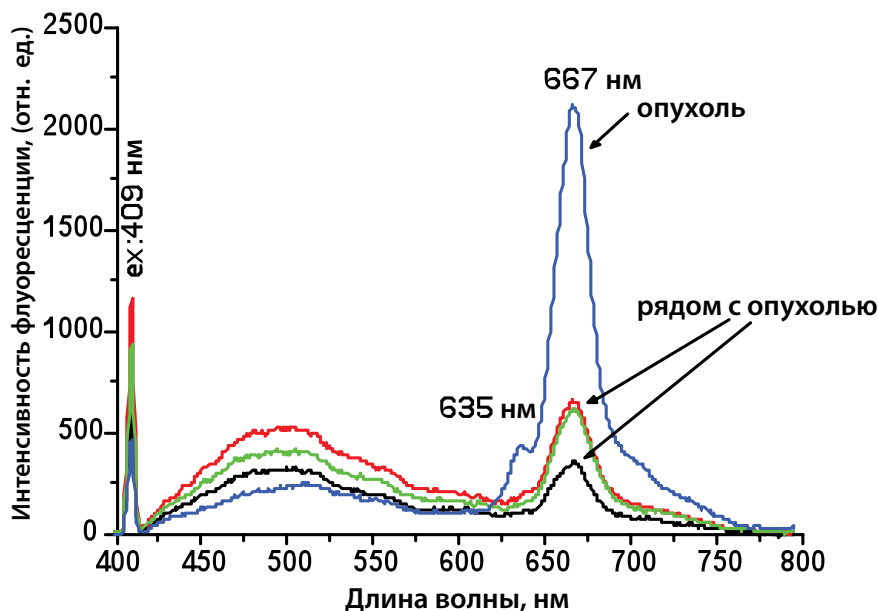


Рис. 4. Спектры флуоресценции опухолей и окружающей ткани рядом с опухолью, измеренные через 3 ч после внутривенного введения фотосенсибилизатора.

ФДТ в лечении как онкологической патологии, так и фоновых и предраковых заболеваний вульвы и шейки матки при использовании фотосенсибилизаторов из класса порфиринов, хлоринов, фталоцианинов. Анализ литературы показывает, что ввиду отсутствия специальной кольпоскопической аппаратуры, многие клинические разработки ФДТ проводились без флуоресцентных исследований [20]. При этом следует отметить, что флуоресцентное сопровождение является крайне важным аспектом при разработке и применении таких методик, поскольку позволяет оптимизировать время проведения ФДТ [18], проводить диагностическое исследование и выявлять границы опухолевого поражения и (или) обнаруживать дополнительные, скрытые очаги патологии [6, 16, 7].

Разработанный нами ЛСФК полностью подходит для клинических исследований в этой области, поскольку позволяет реализовывать все указанные выше

задачи. Прибор может применяться для разработки методик флуоресцентной диагностики и ФДТ онкологической и неонкологической патологии вульвы, влагалища и шейки матки с фотосенсибилизаторами из класса порфиринов и хлоринов. Более того, возможна адаптация прибора для целей интраоперационной флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии.

Настоящая работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Государственного контракта № 16.522.12.2005 от «04» июля 2011.

Список литературы

1. Булгакова Н.Н., Смирнов В.В., Фабелинский В.И. и соавт. Спектрально-флуоресцентный кольпоскоп // Биомедицинская радиоэлектроника, 2013 (в печати).
2. Булгакова Н.Н., Трушина О.И., Новикова Е.Г. и соавт. К методу

- аутофлуоресцентной диагностики ранних форм рака шейки матки: особенности эндогенной флуоресценции покровного эпителия шейки матки // Московский хирургический журнал. 2012. т.6. №28. С. 28-32.
3. **Булгакова Н.Н., Трушина О.И., Новикова Е.Г. и соавт.** Лазерный спектрально-флуоресцентный кольпоскоп. Патент на ПМ №104836.
 4. **Булгакова Н.Н., Трушина О.И., Новикова Е.Г. и соавт.** Разработка метода аутофлуоресцентной диагностики ранних форм рака шейки матки: оптимизация длины волны лазерного возбуждения, Московский хирургический журнал. 2011. т.6. №22. С. 30-34.
 5. **Денисова Е.Д., Аполихина И.А., Булгакова Н.Н.** Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия: возможности применения при заболеваниях нижних отделов половых путей // Акушерство и гинекология. 2010. №3. С.17-21.
 6. **Денисова Е.Д., Аполихина И.А., Булгакова Н.Н.** Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия остроконечных кондилом вульвы с препаратом аласенс // Акушерство и гинекология. 2011. №8. С.112-116.
 7. **Денисова Е.Д., Булгакова Н.Н., Аполихина И.А. и соавт.** Исследование кинетики накопления протопорфирина IX в тканях вульвы после перорального приема 5-аминолевулиновой кислоты // Акушерство и гинекология. 2012. №4-2. С.83-87.
 8. **Козаченко А.В.** Новые направления в диагностике и лечении микрокарциномы шейки матки // Акушерство и гинекология. 2006. №5 с. 56-59.
 9. **Кулаков В.И., Прилепская В.И., Минкина Г.Н. и соавт.** Профилактика рака шейки матки. Руководство для врачей. М. 2007.
 10. **Минкина Г.Н., Минкина Г.Н., Манухин И.Б., Франк Г.А.** Предрак шейки матки. М. 2008.
 11. **Роговская С.И.** Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки.– «Гэотар-Медиа». Москва. 2007. 141 с.
 12. **Русаков И.Г., Соколов В.В., Булгакова Н.Н. и соавт.** Флуоресцентные методы диагностики и поверхностный рак мочевого пузыря: современное состояние проблемы // Урология. 2008. №3. С. 67-71.
 13. **Соколов В.В., Булгакова Н.Н., Дронова О.Б. и соавт.** «Флуоресцентные методы в эндоскопической диагностике тяжелой дисплазии и раннего рака пищевода Барретта» (Обзор литературы) // Российский онкологический журнал. 2008. №3. С. 46-54.
 14. **Соколов В.В., Чиссов В.И., Филоненко Е.В. и соавт.** Флуоресцентная диагностика начального центрального рака легкого // Пульмонология, №1, с.107-11, 2005.
 15. **Чиссов В.И., Соколов В.В., Булгакова Н.Н. и соавт.** Флуоресцентная эндоскопия, дермаскопия и спектрофотометрия в диагностике злокачественных опухолей основных локализаций. // Российский биотерапевтический журнал. 2003. т. 2. №4. С. 45-56.
 16. **Чулкова О.В., Новикова Е.Г., Соколов В.В. и др.** Диагностика и лечение фоновых и предраковых заболеваний вульвы. Практическая онкология. 2006. т.7. №4. С. 197- 204.
 17. **Ascencio M., Collinet P., Cosson M. et al.** The place of photodynamic therapy in gynecology // Gynecol. Obstetr.

- Fertil.. 2007. v.35(11). P.1155-1165.
18. *Hillemanns P., Wang X., Hertel H. et al.* Pharmacokinetics and selectivity of porphyrin synthesis after topical application of hexaminolevulinate in patients with cervical intra-epithelial neoplasia // Am. J. Obstetr. Gynecol. 2008. v.198(3). P. 300-307.
19. *Hillemanns P., Weingandt H., Baumgartner R. et al.* Photodetection of cervical intra-epithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence // Cancer. 2000. v.15;88(10):2275-82.
20. *Trushina O.I., Novikova E.G., Sokolov V.V. et al.* Photodynamic therapy of virus-associated precancer and early stages cancer of cervix uteri // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2008. v. 5(4). P. 256-259.

Laser spectral fluorescence colposcope: preclinical testing on ex-perimental mice tumor

N.N. Bulgakova, V.V. Smirnov, V.I. Fabelinsky, A.G. Fedotov,
N.N. Kazachkina, G.D. Kapanadze

The preclinical testing of laser spectral-fluorescence colposcope developed for autofluorescence detection of cervical neoplasia has been performed using experimental mice tumor. The capability to detect malignant lesions has been tested before (by autofluorescence) and three hours after the injection of a chlorine-based photosensitizer. It was shown that technical solutions which have been implemented in this equipment are adequate for detection of both endogenous (auto-fluorescence) and exogenous fluorescence contrast between a malignant lesion and normal tis-sue. High quality fluorescence imaging and excellent reproducibility of local spectral fluorescence measurements are promising for further applications of this equipment for fluorescence diagnosis and in course of photodynamic therapy of cancer in gynecology.

Key words: cervical carcinoma, autofluorescence, fluorescence diagnostics, colposcope, photo-sensitisers, photodynamic therapy.