

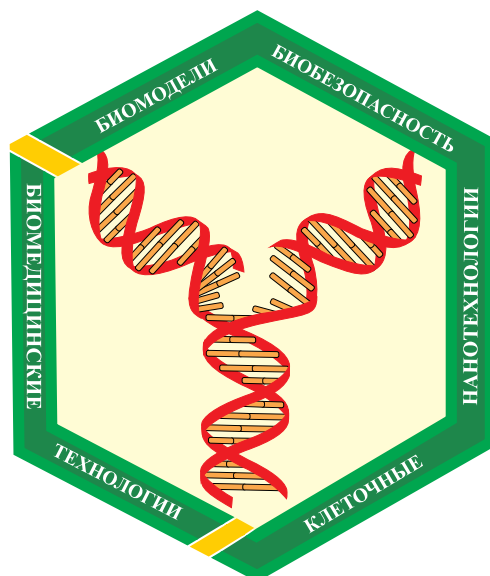
Научный журнал.

Основан в 2005 году ФГБУН «Научный центр 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. Берзин (д.м.н., проф.), Г. Д. Капанадзе (д.б.н., зам. главного редактора),
В. Н. Каркищенко (д.м.н., проф., зам. главного редактора), С. Л. Люблинский (к.б.н.),
Ю. С. Макляков (д.м.н., проф.), Е. Л. Матвеев (к.э.н., доц.), А. Н. Мурашев (д.б.н., проф.),
Г. В. Раменская (д.ф.н., проф.), А. О. Ревякин (к.б.н.), 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,
к.х.н. В. И. Вареник, 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

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 12.09.2013 г.
Тираж 3 000 экз.

Содержание

НОВЫЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, Н.В. Касинская
Кинезогидродинамическая оценка скоростных характеристик физической работоспособности животных в фармакологических исследованиях..... 6

Д.Б. Чайванов, Н.Н. Каркищенко
Трехмерная векторная модель функционального состояния нервной системы как теоретическая основа для диагностики состояния в условиях транскраниальной электрической и магнитной нейростимуляции..... 18

РАБОТОСПОСОБНОСТЬ И ВЫНОСЛИВОСТЬ В СПОРТИВНОЙ БИОМЕДИЦИНЕ

Е.Б. Шустов, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко
Обоснование направлений коррекции функционального состояния спортсменов исходя из методологии экстремальных состояний..... 26

РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

А. Гаджиев, А.В. Волков, И.И. Бобиченко, Е.К. Кречина, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Станкова
Адаптационные механизмы защиты обнаженной пульпы у крыс: к вопросу о биомоделировании острого и хронического пульпита..... 36

А.А. Казаченко, С.В. Оковитый, А.Н. Куликов, Д.Ю. Ивкин, Е.Б. Шустов
Экспериментальное моделирование хронической сердечной недостаточности..... 41

Т.Р. Петросян, О.В. Геворгян
Бактериальный меланин как ускоритель восстановления моторики после повреждения кортико-руброспинальной системы двигательного контроля..... 49

Г.И. Пронина, А.О. Ревякин, Н.Ю. Корягина, А.А. Иванов, А.В. Золотова, Г.Д. Капанадзе, О.И. Степанова, О.В. Баранова
Патологические изменения поджелудочной железы и печени рыб под действием аллоксана..... 59

А.О. Ревякин, Г.И. Пронина, Н.Ю. Корягина, Г.Д. Капанадзе, О.И. Степанова, О.В. Баранова, Н.В. Касинская
Приживаемость клеток костного мозга мышей у рыб и речных раков..... 63

Е.А. Сладкова, М.Ю. Скоркина, Н.А. Забияков
Морфофункциональные особенности клеток крови в условиях опухолевого роста..... 67

А.Г. Соловьева
Особенности каталитических и кинетических свойств альдегиддегидрогеназы в жизненно важных органах при экспериментальной термической травме..... 74

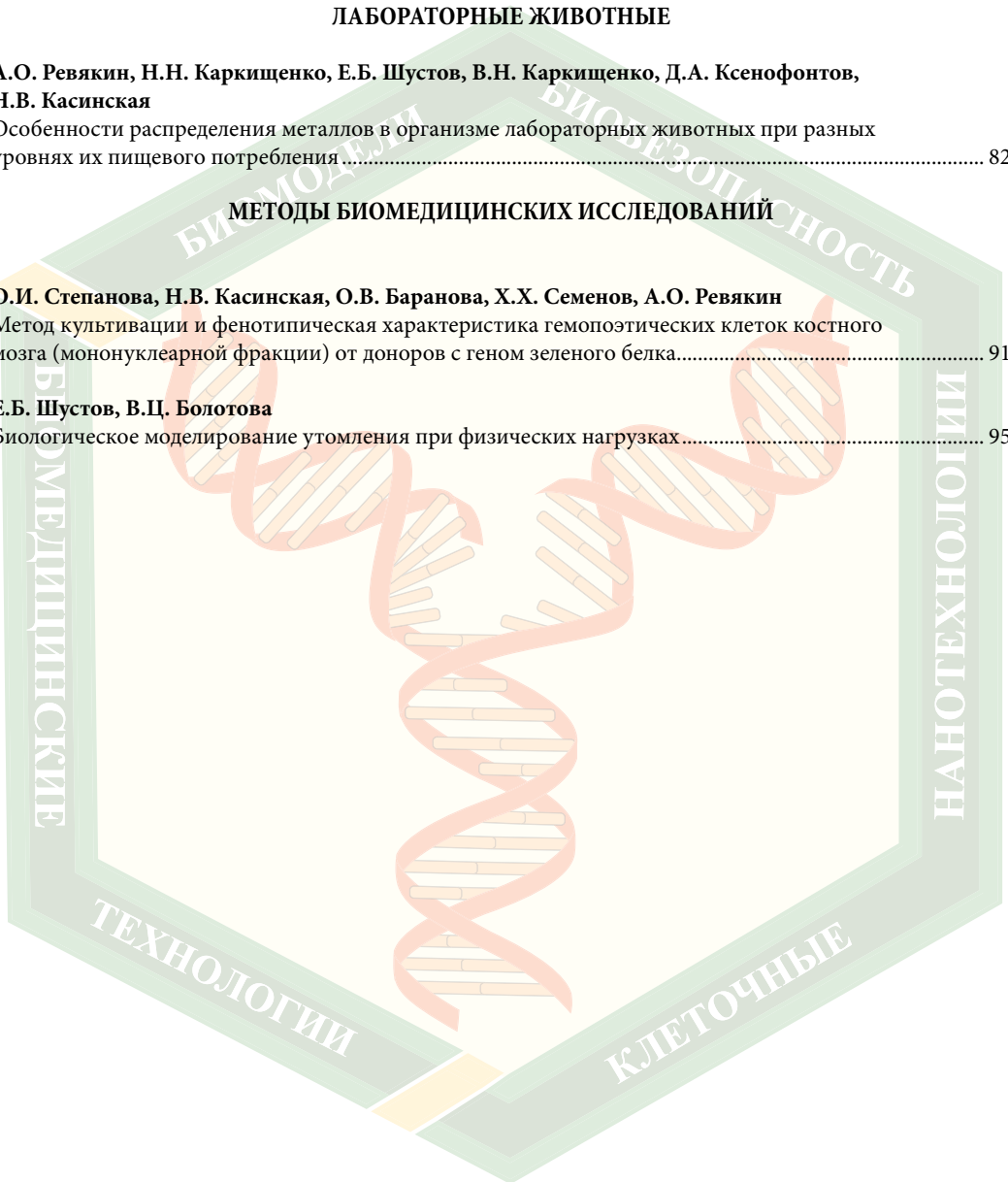
ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

А.О. Ревякин, Н.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Д.А. Ксенофонов, Н.В. Касинская
 Особенности распределения металлов в организме лабораторных животных при разных уровнях их пищевого потребления 82

МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

О.И. Степанова, Н.В. Касинская, О.В. Баранова, Х.Х. Семенов, А.О. Ревякин
 Метод культивации и фенотипическая характеристика гемопоэтических клеток костного мозга (моноклеарной фракции) от доноров с геном зеленого белка 91

Е.Б. Шустов, В.Ц. Болотова
 Биологическое моделирование утомления при физических нагрузках 95



Content

NEW BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko, E.B. Shustov, N.V. Kasinskaya The kinezohydrodynamic assessment of high-speed characteristics of physical efficiency of animals in pharmacological researches.....	6
D.B. Chayvanov, N.N. Karkischenko Three-dimensional vector model of neuronal system functional condition as theoretical base for condition diagnostic under transcranial electric and magnetic neurostimulation.....	18

WORKING CAPACITY AND ENDURANCE IN SPORTS BIOMEDICINE

E.B. Shustov, N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko Justification directions of correction of functional state of athletes according to the basis of the methodology of extreme states.....	26
--	----

RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELING

A. Gadzhiyev, A.V. Volkov, I.I. Bobichenko, E.K. Krechina, G.D. Kapanadze, N.V. Stankova Adaptation mechanisms of protection pulp exposure in rats: the issue of biomodeling of acute and chronic pulpitis.....	36
A.A. Kazachenko, S.V. Okovityy, A.N. Kulikov, D.Yu. Ivkin, E.B. Shustov Experimental modeling of chronic warm insufficiency.....	41
T.R. Petrosyan, O.V. Gevorgyan Bacterial melanin as an accelerator of motility recovery after damage of cortico-rubrospinal motor control system.....	49
G.I. Pronina, A.O. Revyakin, N.Yu. Koryagina, A.A. Ivanov, A.V. Zolotova, G.D. Kapanadze, O.I. Stepanova, O.V. Baranova Pathological changes of the pancreas and liver of fishes under the influence of alloxan.....	59
A.O. Revyakin, G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, G.D. Kapanadze, O.I. Stepanova, O.V. Baranova, N.V. Kasinskaya Survival of mice marrow cells at fishes and river crayfish.....	63
E.A. Sladkova, M.Yu. Skorkina, N.A. Zabinyakov Morphological and functional peculiarities of blood cells at tumor growth condition.....	67
A.G. Solov`eva Features of the catalytic and kinetic properties of aldehyde dehydrogenase to the vital organs in experimental thermal injury.....	74

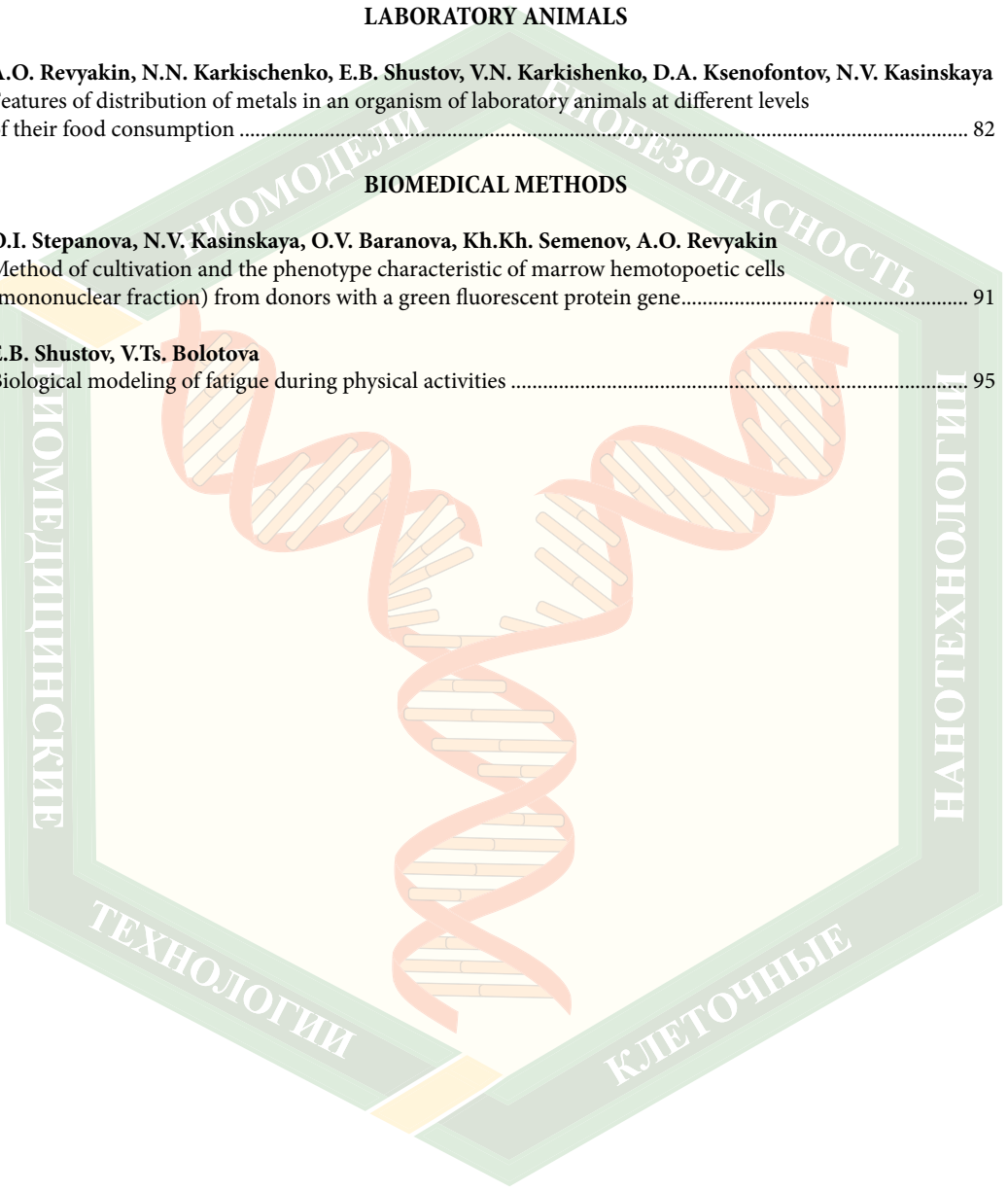
LABORATORY ANIMALS

A.O. Revyakin, N.N. Karkischenko, E.B. Shustov, V.N. Karkishenko, D.A. Ksenofontov, N.V. Kasinskaya
 Features of distribution of metals in an organism of laboratory animals at different levels
 of their food consumption 82

BIOMEDICAL METHODS

O.I. Stepanova, N.V. Kasinskaya, O.V. Baranova, Kh.Kh. Semenov, A.O. Revyakin
 Method of cultivation and the phenotype characteristic of marrow hemopoietic cells
 (mononuclear fraction) from donors with a green fluorescent protein gene..... 91

E.B. Shustov, V.Ts. Bolotova
 Biological modeling of fatigue during physical activities 95





Кинезогидродинамическая оценка скоростных характеристик физической работоспособности животных в фармакологических исследованиях

Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Е.Б. Шустов, Н.В. Касинская

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская обл.

Контактная информация: д.м.н., проф. Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

Представлены статистические характеристики кинезогидродинамической модели исследования скоростных характеристик физической работоспособности мелких лабораторных животных – белых крыс. Показана возможность использования данной модели в доклинических исследованиях для оценки влияния лекарственных средств на работоспособность животных.

Ключевые слова: работоспособность, кинезогидродинамическая модель, фармакологическая коррекция работоспособности.

К числу самых современных методов исследования физической работоспособности на биологических моделях (крысах) относится кинезогидродинамическая оценка. Основным принципом кинезогидродинамической модели является создание гидроканала с изменяющимся встречным потоком жидкости, который должно преодолевать лабораторное животное. Гидроканал из прозрачного пластика прямоугольной и равнобокой трапециевидной формы, длиной 200 см в поперечном сечении, оснащается с торцевых сторон водосборниками, обеспечивающими ламинарность потоков воды, циркуляционным насосом с регулируемой мощ-

ностью прокачки, теплообменниками для нагрева или охлаждения прокачиваемой жидкости. После включения циркуляционного насоса система стабилизируется на скорости квазиламинарного потока воды не ниже 5-ти м/мин и температуре воды +24°C. Установленные на борту гидроканала градуированная шкала, датчики перемещения животного, видеокамера сопровождения обеспечивают корректную регистрацию кинезодинамики, скорость перемещения и длительность плавания животного. Несомненным преимуществом модели является возможность плавного изменения нагрузки, в т.ч. имитация финишного рывка животного.

Компьютерная обработка результатов исследования позволяет сопоставлять режимы нагрузок, этапы энергопродукции, признаки утомления животных, что дает возможность получать информацию для всестороннего анализа влияния изучаемых фармакологических средств на физическую работоспособность животных [1, 4].

На рис. 1 представлена принципиальная схема кинезогидродинамической модели. Для исследования кинезогидродинамических характеристик подопытных

составляла в процессе разработки от 100 до 200 см. Высота уровня жидкости равна 0,2 м.

Преимущество разработанной модели (внешний вид устройства представлен на рис. 2) заключается, прежде всего, в объективизации и визуализации регистрируемых эффектов, получении дополнительной информации, сравнении и корреляции с биохимическими параметрами, исключении субъективных и неточных показателей измерений, имеющих в других методах.

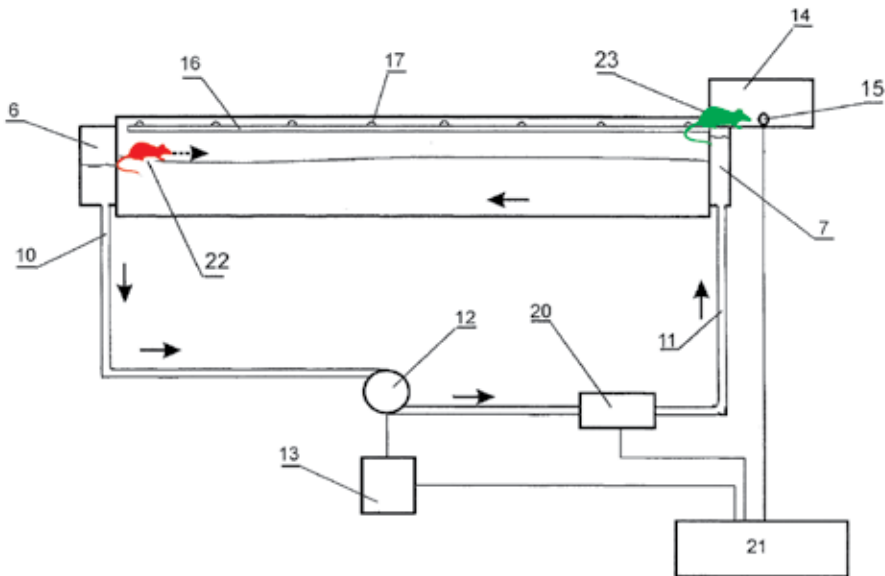


Рис. 1. Принципиальная схема кинезогидродинамической модели.

Обозначения: 1 – чаша; 2, 3, 4, 5 – торцевые и боковые стенки чаши, соответственно; 6 и 7 – сообщающиеся с атмосферой водосборники; 8 и 9 – входные и сливные отверстия, соответственно; 10 и 11 – трубопроводы; 12 – циркуляционный насос; 13 – регулятор скорости вращения; 14 – домик-приманка; 15 – емкостной датчик отключения системы прокачки; 16 – калибровочная шкала; 17 – датчики перемещения; 18 – видеокамера сопровождения; 19 – датчик температуры; 20 – узел подогрева или охлаждения прокачиваемой жидкости; 21 – компьютер.

животных (лабораторные крысы линии WAG/GY) используют гидроканал (физические размеры чаши гидроканала в виде параллелепипеда прямоугольной формы в поперечном сечении составляют 0,4×0,2×0,4 м). Длина гидроканала

Важной и практически значимой для спортивной медицины характеристикой физической работоспособности являются скоростные параметры (средняя скорость, стартовый и финишный рывок) выполняемой работы. Однако традици-

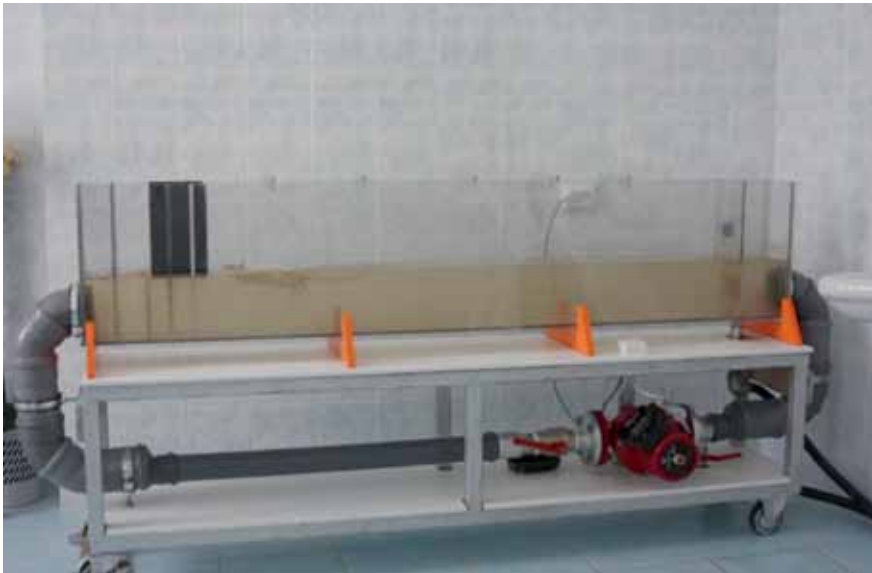


Рис. 2. Устройство для кинезогидродинамического моделирования физической работоспособности.

онно используемые методы исследования физической нагрузки (тесты вынужденного плавания или бега на тредбане) ориентированы преимущественно на анализ выносливости и не учитывают скоростных характеристик работоспособности.

Наиболее корректно скоростные характеристики работоспособности могут быть оценены только в кинезогидродинамическом исследовании. При этом в каждый момент времени i собственная скорость перемещения животного в гидроканале должна суммироваться со скоростью встречного потока воды. Для гидроканала со стабильным ламинарным потоком это уравнение имеет следующий вид:

$$V_i = V_0 + V_1,$$

где V_i – скорость плавания; V_0 – скорость потока воды; V_1 – скорость перемещения животного по гидроканалу, равная отношению длины мерного участка к времени его проплыва. Таким образом, для определения скоростных характеристик работо-

способности необходимо знать скорость ламинарного потока в момент тестирования и время прохождения животным мерного участка. Для определения средней скорости учитывается время проплыва всей длины рабочей зоны гидроканала, стартовой и финишной скорости – первых и последних 50 см дистанции.

Для фармакологических исследований основное значение имеет средняя скорость плавания животных. Для обеспечения лучшей сопоставимости результатов скорость потока воды должна быть одинаковой на всем протяжении исследования, так как в случае ее повышения или понижения в силу изменения гидродинамического сопротивления будет меняться и величина нагрузки на животное, и степень его утомления (как правило, нелинейно). При константных значениях скорости потока воды динамика скоростных характеристик работоспособности может быть оценена по первично измеряемому показателю – времени проплыва животного (с учетом обратной пропорциональности величин).

Для отработки статистических параметров модели было выполнено несколько серий исследований с крысами линии WAG/GY, самками массой $200 \pm 12,2$ г. Скорость встречного потока воды была установлена равной 14 м/мин (0,233 м/с). Такой встречный поток оказывает крысам ощутимое сопротивление и без активного плавания быстро сносит их к торцевой стенке гидроканала.

В первой серии исследований оценивались статистические параметры плавания необученных крыс. Затем на протяжении 3-х дней крыс обучали плаванию в заданном направлении в гидроканале, на меньшей скорости встречного потока воды. Повторное тестирование осуществлялось через сутки после завершения обучения. Результаты статистического описания полученного массива данных представлены в табл. 1 и на рис. 3.

Полученные данные показывают, что без предварительного обучения пла-

ванию параметры выборки животных существенно отличаются от таковых нормального статистического распределения (большая разница между средним значением, модой и медианой, высокие значения асимметрии и коэффициента вариации, размаха вариативности). Обучение плаванию приблизило величины к нормальному распределению, уменьшило размах вариативности за счет сокращения доли медленно плавающих животных. Повысилась доля животных с высокой скоростью плавания. Следовательно, данные, полученные после обучения животных, могут быть распространены на генеральную совокупность, и в исследовании должны включаться только животные, прошедшие предварительное обучение плаванию в гидроканале.

Дисперсионный факторный анализ различий между двумя выборками по фактору «Предварительное обучение животных» показал, что они различают-

Таблица 1

Описательная статистика продолжительности плавания крыс в гидроканале без и после трехдневного предварительного обучения

Статистический параметр	До обучения	После обучения
Среднее	22,93548	15,03774
Стандартная ошибка	1,150015	0,380776
Медиана	20	14,5
Мода	12	15
Стандартное отклонение	11,09035	5,544178
Дисперсия выборки	122,9958	30,73791
Эксцесс	0,493946	0,195039
Асимметричность	1,046279	0,719111
Размах вариативности	45	25
Минимум	10	5
Максимум	55	30
Счет	93	212
Коэффициент вариации	0,48	0,37

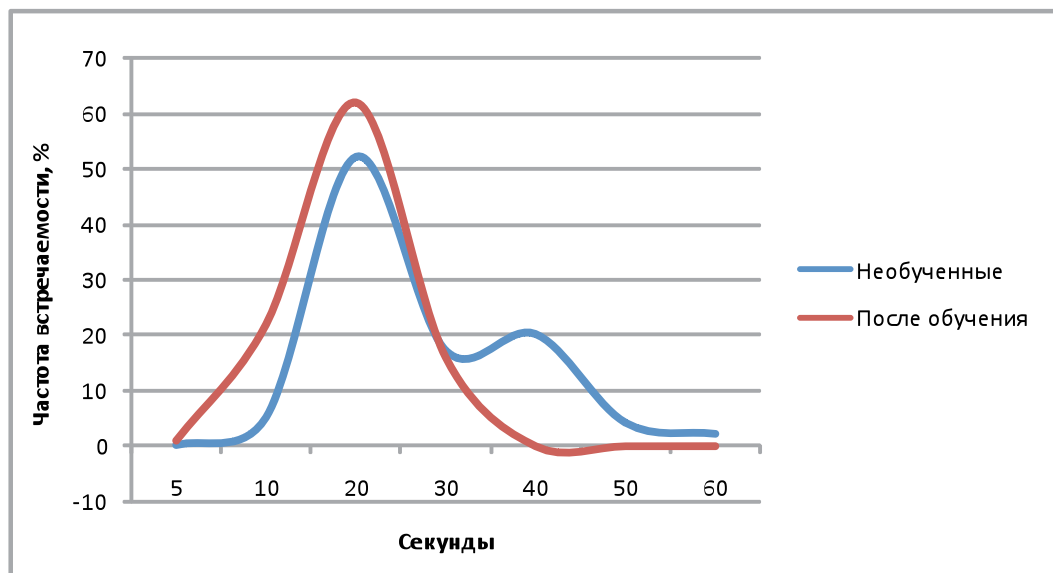


Рис. 3. Частотный анализ времени проплыва крысами мерного участка кинезогидродинамического устройства.

ся с уровнем значимости $p=6 \cdot 10^{-13}$, и 21% вариативности признака (продолжительность проплыва мерного участка) связаны с проведенным их предварительным обучением плаванию в гидроканале.

В фармакологических исследованиях достаточно часто возникают ситуации повторного тестирования животных, при этом сам факт тестирования может оказывать тренировочное значение. В связи с

Таблица 2

Результаты дисперсионного анализа фактора «Тренировка»

Группы	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия		
T1	48	739	15,39583	30,92509		
T2	42	652	15,52381	43,08479		
T3	42	659	15,69048	37,14576		
T4	30	390	13	15,7931		
T5	30	449	14,96667	31,75747		
T6	20	299	14,95	10,78684		
Дисперсионный анализ						
Источник вариации	SS	df	MS	F	P-значение	F критическое
Между группами	158,8499	5	31,76998	1,03442	0,398412	2,257909
Внутри групп	6326,848	206	30,71286			
Итого	6485,698	211				

этим была выполнена серия исследований по оценке дополнительного тренировочного воздействия повторных тестовых исследований. С этой целью предварительно обученные плаванию в гидроканале животные повторно, до 7 раз включительно, с интервалом в 1-2 дня, тестировались на кинезогидродинамической установке. Полученный массив данных был обработан методом однофакторного дисперсионного анализа (фактор «Тренировка»). Было установлено (табл. 2), что центры рассеивания подгрупп, сформированных по кратности тренировок от 1 до 6, находятся достаточно тесно, и с уровнем значимости 0,61 составляют общую, не дифференцированную группу. В то же время, 7-кратная тренировка выводит животных на новый уровень устойчивости, сопровождающийся увеличением скорости плавания практически на 30%, и эти отличия от массива тренировок с кратностью от 1 до 6 имеют значимость статистических тенденций ($p=0,07$).

Следовательно, если планом фармакологического исследования предусмотрено не более 6-ти повторных тестирований работоспособности в кинезогидродинамической установке, то эффект тренировки при этом еще не развивается, и исследование можно выполнять с единой контрольной группой. Но исследования с большим количеством повторных тестирований уже будут чувствительны к фактору тренировки.

При выбранной нами скорости встречного потока воды (14 м/мин, или 0,234 м/с) у предварительно обученных крыс параметр средней скорости плавания имеет нормальное статистическое распределение (рис. 4), что позволяет использовать эти данные как приближенные к популяционному контролю (табл. 3).

Так как для фармакологических исследований зачастую важны не абсолютные значения скорости плавания животных, а их относительные изменения, то для исследователей может быть

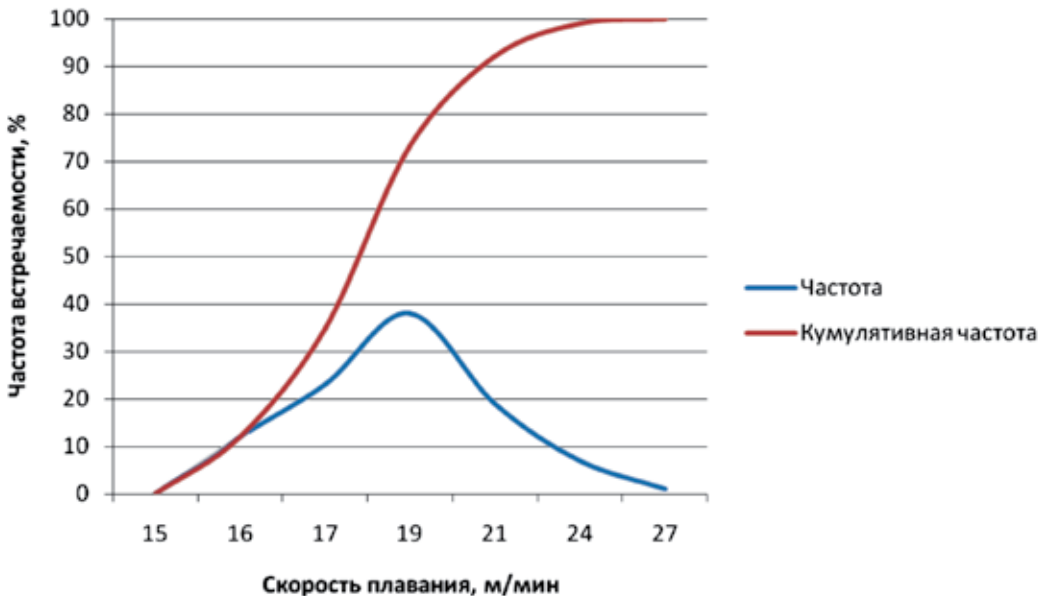


Рис. 4. Частотный анализ распределения скорости плавания крыс в гидродинамическом канале при встречном потоке воды 14 м/мин.

Таблица 3

Статистическое описание среднего времени плавания крыс в гидроканале

Статистический параметр	Скорость плавания, м/с	Скорость плавания, м/мин
Среднее	0,317961	19,07765
Стандартная ошибка	0,002259	0,135543
Медиана	0,309952	18,59714
Мода	0,307333	18,44
Стандартное отклонение	0,032892	1,973535
Дисперсия выборки	0,001082	3,894841
Эксцесс	1,430279	1,430279
Асимметричность	1,124173	1,124173
Интервал	0,183333	11
Минимум	0,270667	16,24
Максимум	0,454	27,24
Счет	212	212

Таблица 4

Шкала стеновых (нормированных баллов) для оценки скорости плавания крыс в гидроканале при встречном потоке воды 14 м/мин

Показатель	Стены (нормированные баллы)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
сек	30 и более	27-29	22-26	18-21	13-17	11-12	9-10	8	7-6	5 и менее
м/с	0,27 и менее	0,272-0,275	0,276-0,284	0,285-0,296	0,297-0,319	0,320-0,334	0,335-0,356	0,357-0,372	0,373-0,429	0,430 и более
м/мин	16,2 и менее	16,3-16,5	16,6-17,0	17,1-17,7	17,8-19,1	19,2-20,0	20,1-21,4	21,5-22,3	22,4-25,0	25,1 и более

предложена шкала стенов (10-балльная нормированная шкала, соотнесенная с генеральной совокупностью). При этом среднее значение для контрольной группы животных равно 5, а сдвиг более чем на 2 стена является статистически значимым с уровнем значимости $p=0,05$; более чем на 4 стена – с уровнем значимости $p=0,01$ (табл. 4).

Для фармаколога важным является определить ключевые точки воздействия на анализируемый параметр работоспо-

собности. Очевидно, что скоростные характеристики любой физической работы зависят от активности медиаторных систем мозга, а также от метаболического (энергетического) обеспечения мышечной деятельности. В связи с этим было выполнено исследование скоростных характеристик плавания животных в гидроканале со встречным потоком воды при измененном «медиаторном пейзаже» мозга.

Системное накопление в мозге нейромедиаторов [3] достигалось с помощью

трехдневного приема фармакологических препаратов.

1. **Ацетилхолин** накапливался за счет применения *галантамина* (препарат «Нивалин», в дозе 1 мг/кг, перорально). Это селективный, конкурентный и обратимый ингибитор ацетилхолинэстеразы, который стимулирует преимущественно никотиновые рецепторы и повышает чувствительность постсинаптической мембраны к ацетилхолину. Облегчает проведение возбуждения в нервно-мышечном синапсе и восстанавливает нервно-мышечную проводимость. Повышая активность холинергической системы, галантамин улучшает когнитивные функции у животных и человека.

2. **Гамма-аминомасляная** кислота накапливалась в тканях мозга за счет приема экзогенной ГАМК (препарат «Аминалон», в дозе 60 мг/кг, перорально) – ноотропного средства, принимающего участие в нейромедиаторных и метаболических процессах в мозге. ГАМК является основным тормозным нейромедиатором, ГАМК-рецепторы широко распространены в ЦНС человека и млекопитающих и выявляется примерно в 50% нервных окончаний мозга.

3. **Серотонин** накапливался за счет применения *сертралина* (препарат «Ципралекс», в дозе 1 мг/кг, перорально) – антидепрессанта, селективного ингибитора обратного захвата преимущественно серотонина, не взаимодействующего с м-холино-, серотониновыми, допаминовыми, гистаминовыми, адрено-, ГАМК- и бензодиазепиновыми рецепторами.

4. **Дофамин** накапливался в тканях мозга за счет применения *накома* (препарат «Наком», в дозе 180 мг/кг, перорально) – противопаркинсонического средства, устраняющего или уменьшающего напряженность мышц, скованность движе-

ний, затем уменьшающего дрожание рук, головы, признаки паркинсонизма и модулирующего поведение и двигательную активность животных. Наком содержит L-ДОФА (предшественник дофамина) и карбидопу (периферический ингибитор фермента ДОФА-декарбоксилазы, разрушающего L-ДОФА в крови и периферических тканях). В результате действия Накома происходит накопление L-ДОФА в крови до уровня проницаемости гематоэнцефалического барьера и ее эффективное накопление в тканях мозга.

5. **Норадреналин** накапливался за счет применения *атомоксетина* (препарат «Страттера», в дозе 1 мг/кг, перорально) – высокоселективного мощного ингибитора пресинаптических переносчиков норадреналина с минимальным сродством к другим норадренергическим рецепторам. Атомоксетин не относится к психостимуляторам, нормализует дефицит внимания и гиперактивность животных и человека.

Тестирование физической работоспособности лабораторных животных осуществлялось в описанной выше кинезогидродинамической установке на предварительно обученных крысах ежедневно, через 1-1,5 ч после введения препарата. Достоверность различий с контролем оценивалась методом однофакторного дисперсионного анализа (факторы «Прием препарата» и, если фактор приема препаратов был значимым, то дополнительно проводился анализ по фактору «Длительность приема препарата»).

Результаты влияния изменения «медиаторного пейзажа» на скорость плавания животных в гидроканале представлены в табл. 5 и на рис. 5.

Анализ полученных данных показывает, что трехдневное накопление в тканях мозга ацетилхолина и норадреналина способствует достоверному (на 10%, $p=0,02$)

Влияние изменения «медиаторного пейзажа» на скорость плавания крыс в гидроканале

Медиатор	Скорость плавания, м/мин, по дням приема		
	1	2	3
Контроль	19,1±0,1		
Ацетилхолин % от контроля	17,5±0,2 92 p=0,05	20,2±0,5 106 p=0,07	21,1±0,6 110 p=0,02
ГАМК % от контроля	18,0±0,4 94 p=0,25	20,0±0,8 105 p=0,18	19,4±0,6 101 p=0,41
Серотонин % от контроля	17,9±0,1 94 p=0,35	19,0±0,4 99 p=0,60	19,1±0,4 100 p=0,45
Дофамин % от контроля	16,9±0,2 88 p=0,0001	15,6±0,1 81 p=8*10 ⁻²⁸	15,5±0,1 80 p=3*10 ⁻³⁰
Норадреналин % от контроля	18,9±0,4 99 p=0,70	18,9±0,4 99 p=0,65	20,8±0,2 109 p=0,02

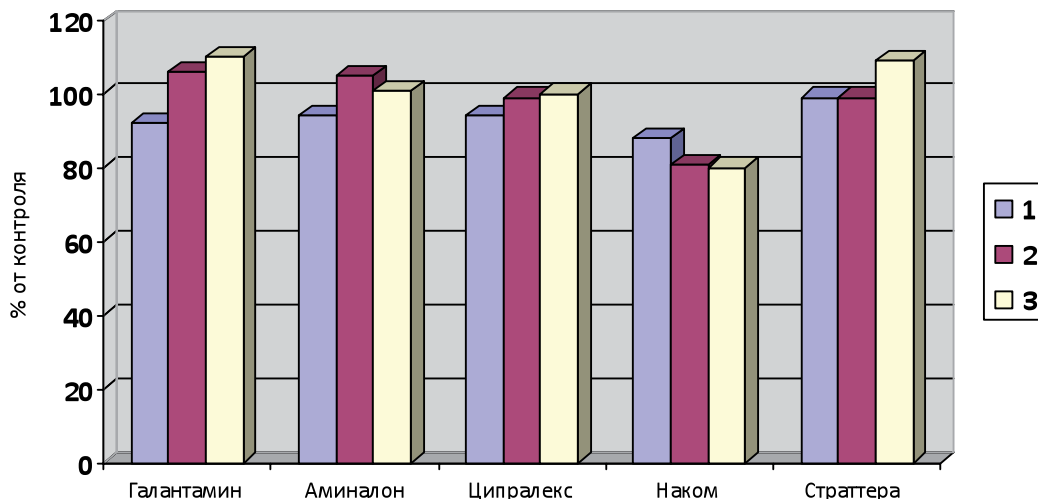


Рис. 5. Влияние кратности приема препаратов на скорость плавания крыс.

повышению скорости плавания животных, причем накопление ацетилхолина в первые сутки может снизить скорость плавания (в среднем, на 8%, $p=0,05$), но уже при втором приеме галантамина наблюдается небольшой прирост этого показателя к уровню контрольных животных (+6%, $p=0,07$). Повышение концентрации в тканях мозга ГАМК и серотонина не влияло на скорость плавания животных, а дофамина – существенно

ухудшало этот показатель (однократный прием Накома снижал скорость плавания, в среднем, на 12%, последующие второй и третий приемы – на 19-20%).

Для трех препаратов, продемонстрировавших достоверное влияние на скорость плавания животных, был выполнен дисперсионный анализ фактора «Длительность приема препарата». Его результаты для Галантамина представлены в табл. 6.

Таблица 6

Результаты дисперсионного анализа фактора «Длительность приема препарата» для Галантамина

Группы	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия		
T1	6	105,0152	17,50254	0,343565		
T2	6	121,4067	20,23444	1,299741		
T3	6	126,4352	21,07254	1,904766		
D = 0,702152						
Дисперсионный анализ						
Источник вариации	SS	df	MS	F	P-значение	F критическое
Между группами	41,82133	2	20,91067	17,68059	0,000113	3,68232
Внутри групп	17,74036	15	1,18269			
Итого	59,56169	17				

Таким образом, эффект приема Галантамина существенно и достоверно (коэффициент детерминации $D=0,70$; $p=0,0001$) зависит от длительности его применения.

Для Норадrenalина (препарат «Страттера») фактор длительности приема был несколько менее значим (коэффициент детерминации $D=0,44$; $p=0.01$). Особенно выраженное значение фактор длительности приема играл для дофаминового звена (препарат «Наком»): повторное применение препарата усиливало его **негативное влияние** на скорость плавания животных (коэффициент детерминации $D=0,83$; $p=2*10^{-6}$).

Для проверки влияния вектора метаболического обеспечения физической работы на скорость плавания животных были проведены испытания специализированного продукта спортивного питания «МиоАктив-Спорт» [2]. В состав продукта входят легкоусвояемые полноценные белки и полипептиды животного происхождения, среднецепочечные триглицериды, мальтодекстрин, лецитин, минералоорганические формы макро-

микроэлементов (в т.ч. гемового железа из гемоглобина, органического йода в виде йодированных молочных сывороточных белков, биогенного кальция из яичной скорлупы), природный поливитаминный комплекс из сублимированных ягод и плодов, субстраты цикла Кребса (лимонная и янтарная кислоты), нерастворимые и растворимые пищевые волокна. Указанный пищевой комплекс вводился крысам в эквивалентных рекомендуемых для спортсменов дозах, 1 раз в день перорально, ежедневно на протяжении 21 дня. На 2-й, 7-й, 14-й, 21-й дни приема, а также спустя 7 дней после его прекращения (для выявления следовых эффектов) проводилось тестирование физической работоспособности животных на кинезогидродинамической модели. Результаты исследования представлены в табл. 7 и на рис. 6.

Таким образом, специализированное спортивное питание «МиоАктив-Спорт» начинает оказывать положительное влияние на скорость плавания лабораторных животных уже со 2-го дня приема. Особенно заметным это влияние стано-

Влияние приема рецептуры «МиоАктив-Спорт» на скорость плавания животных в гидроканале

Группа	Скорость плавания, м/мин, по дням исследования				
	2	7	14	21	28
Контроль	19,1±0,1				
МиоАктив-Спорт % от контроля	19,7±0,5 103 p=0,08	20,2±0,5 105 p=0,04	23,9±0,7 125 p=1*10 ⁻⁵	24,6±0,7 128 p=2*10 ⁻⁶	23,1±0,8 121 p=1*10 ⁻⁴



Рис. 6. Влияние курсового приема рецептуры «МиоАктив-Спорт» на скорость плавания животных (в нормированных по популяции баллах (стенах)).

Примечание: 0 – значение для контрольной группы; 2, 7, 14, 21 – дни приема «МиоАктив-Спорт»; 28 – значения через 7 дней после его прекращения (следовой эффект).

вится к 14-му дню приема (+25% к контролю). Дальнейший прием рецептуры «МиоАктив-Спорт» не усиливает скоростные характеристики работоспособности животных, однако важным показателем является достаточно длительное сохранение (не менее 7-ми дней) полученного результата.

Выводы

1. Кинезогидродинамическая модель является адекватной для исследования скоростных характеристик физической работоспособности лабораторных животных.

2. Статистическое распределение скорости плавания животных в гидроканале

при встречном потоке воды со скоростью 14 м/мин соответствует критериям нормального распределения, а полученные статистические параметры могут быть распространены на генеральную совокупность.

3. Предложенная в статье нормированная по генеральной совокупности бальная шкала (шкала стенов) является удобным инструментом в фармакологических исследованиях.

4. Поиск фармакологических средств, повышающих скоростные качества животных при выполнении ими физической работы, целесообразно вести среди лекарственных средств, обеспечивающих накопление ацетилхолина и норадренали-

на в нервной системе, или среди средств метаболического действия, улучшающих энергетические и пластические процессы в организме.

5. Накопление дофамина в ЦНС не является желательным для повышения скоростных характеристик работоспособности.

6. Накопление ГАМК и серотонина в ЦНС не сопровождается повышением скоростных качеств физической работы.

7. Специализированный продукт спортивного питания «МиоАктив-Спорт» может быть рекомендован для приема спортсменами, тренирующими скоростно-силовые качества.

Список литературы

1. *Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н.* Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии // Спортивная медицина. № 1. 2013. С. 7-17.
2. *Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Касинская Н.В., Семенов Х.Х., Степанова О.И., Люблинский С.Л., Берзин И.А., Колышев И.Ю.* Влияние рецептуры «МиоАктив-Спорт» на психофизические показатели лабораторных крыс // Биомедицина. 2012. № 4. С. 22-31.
3. *Каркищенко Н.Н.* Фармакология системной деятельности мозга. – Р.-н.-Д.: Ростиздат. 1975. 260 с.
4. *Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н.* Кинезогидродинамическая модель для оценки выносливости и работоспособности лабораторных животных // Биомедицина. 2012. № 4. С. 6-14.

The kinezohydrodynamic assessment of high-speed characteristics of physical efficiency of animals in pharmacological researches

N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko, E.B. Shustov, N.V. Kasinskaya

The statistical characteristics of kinezohydrodynamic model of research of high-speed characteristics of physical efficiency of small laboratory animals – white rats are submitted. Possibility of its use in preclinical researches for an assessment of influence of medicines on efficiency of animals is shown.

Key words: working capacity, kinezohydrodynamic model, pharmacological correction of working capacity.

Трехмерная векторная модель функционального состояния нервной системы как теоретическая основа для диагностики состояния в условиях транскраниальной электрической и магнитной нейростимуляции

Д.Б. Чайванов¹, Н.Н. Каркищенко²

¹ – НИЦ «Курчатовский институт», Москва

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

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

В статье рассматриваются физические методы диагностики функционального состояния нервной системы, совместимые с транскраниальной электрической и магнитной нейростимуляцией. В качестве теоретической базы методов предложена оригинальная трехмерная векторная модель функционального состояния нервной системы.

Ключевые слова: физические методы психодиагностики, диагностика функционального состояния нервной системы, транскраниальная нейростимуляция.

Трехмерная векторная модель функционального состояния нервной системы

В целях диагностики функционального состояния нервной системы человека в условиях транскраниальной биоуправляемой полимодальной нейростимуляции представляется удобным сопоставлять каждому функциональному состоянию нервной системы точку трехмерного пространства. При этом в качестве координат такого пространства удобно предложить следующие характеристики:

- 1) уровень возбуждения центральной нервной системы;
- 2) ориентация фокуса внимания первой сигнальной системы на внешние или на внутренние процессы;
- 3) ориентация фокуса внимания второй сигнальной системы на внешние или на внутренние процессы.

В качестве примера рассмотрим положение некоторых функциональных состояний нервной системы в такой системе координат.

При бодрствовании, сопровождающемся действиями и речью, фокус внимания первой и второй сигнальной системы ориентированы преимущественно вовне, уровень возбуждения может меняться в широких пределах – от расслабленного состояния к активному бодрствованию и перевозбуждению. При бодрствовании, сопровождающемся воспоминаниями с периодическими действиями и/или вербализацией, фокус внимание первой и второй сигнальной системы периодически смещается внутрь, оставаясь в целом, скорее ориентированным вовне, чем внутрь.

При бодрствовании, сопровождающемся размышлениями и внутренним

диалогом, фокус внимания второй сигнальной системы ориентируется преимущественно внутрь, первая сигнальная система при этом ориентирована вовне, однако при воспоминании вербализуемых первой сигнальной системой символов может частично обращаться внутрь. Уровень возбуждения меняется от расслабления (например, при медитации и монотонии) к активному бодрствованию и перевозбуждению. Состояние бодрствования, сопровождающееся внутренним диалогом и перевозбуждением, характерно для ряда психических нарушений, например, неврозов и фобий.

В состоянии сна первая и вторая сигнальные системы ориентированы преимущественно внутрь, уровень, возбуждения меняется, нарастая от четвертой к третьей, второй и первой стадии сна, достигая максимума при быстром сне. В состоянии быстрого сна некоторые стимулы, частично воспринимаемые первой сигнальной системой, могут трансформироваться в символы и реализовываться – как проекции таких символов – в сновидения.

В состоянии гипнотического транса фокус внимания первой сигнальной системы ориентирован внутрь, фокус внимания второй сигнальной системы направлен вовне. Человек в состоянии транса воспринимает речь гипнотизера, но при этом игнорирует прочие звуковые стимулы, включая речь негипнотизера. Уровень возбуждения может варьироваться в широких пределах.

Для большей наглядности представим проекции областей четырех основных базовых состояний на плоскость с осями координат, отражающим фокус внимания первой сигнальной системы и фокус внимания второй сигнальной системы (рис. 1).

На приведенном выше рисунке ориентации сигнальных систем полностью на внутренние процессы соответствует нулевое значение, ориентации на внешние процессы – единица.

Связь фокуса внимания первой сигнальной системы с уровнем возбуждения

Ориентация фокуса внимания первой сигнальной системы вовне ведет к акти-

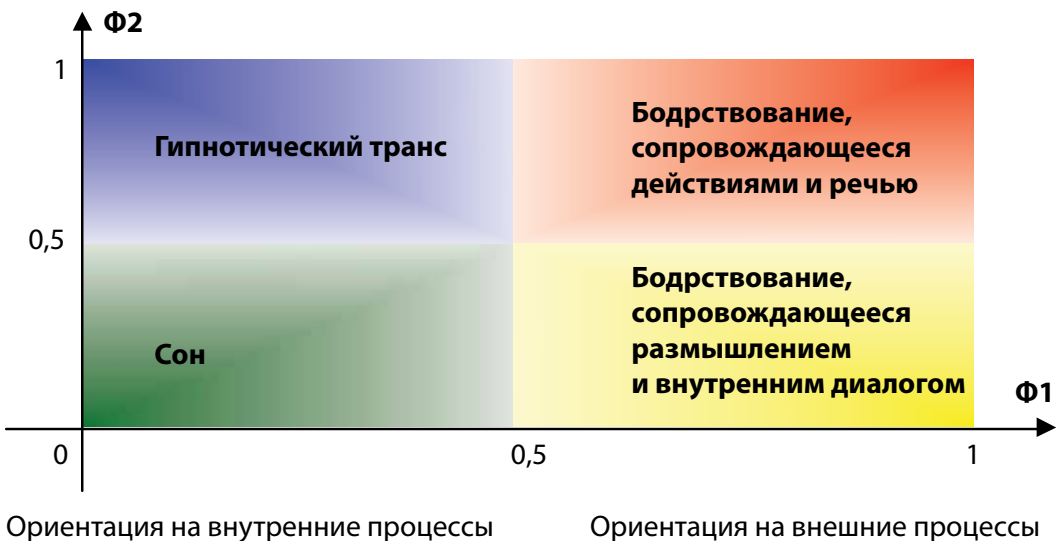


Рис. 1. Проекция областей основных базовых состояний на плоскость с осями фокуса внимания первой сигнальной системы (Φ_1) и фокуса внимания второй сигнальной системы (Φ_2).

вазии сенсорных систем и росту потока раздражителей к соответствующим ядрам головного мозга. Это повышает уровень активации, включая возбуждение коры, и повышает тонус мускулатуры.

Напротив, смещение фокуса внимания первой сигнальной системы внутрь приводит к уменьшению потока раздражителей извне и рефлекторному расслаблению мускулатуры, что активизирует процессы торможения и уменьшает уровень возбуждения.

Торможение ствола головного мозга, вызванное утомлением, фармакологическими и физиотерапевтическими воздействиями, приводит к уменьшению потока раздражителей от сенсорных систем к коре головного мозга и переориентирует фокус внимания первой сенсорной системы внутрь.

Напротив, возбуждение ствола головного мозга увеличивает поток раздражителей от сенсорных систем, что приводит к переориентации фокуса внимания вовне.

В состоянии быстрого сна мы, вероятно, имеем парадоксальную ситуацию торможения ядер ствола, отвечающих за передачу сенсорных раздражителей, с одновременной общей активацией как подкорковых, так и корковых структур, в том числе проявляющейся в быстром движении глаз и иногда даже спонтанном сокращением мускулатуры.

В состоянии гипнотического транса, вероятно, реализуется еще более парадоксальная ситуация: возбуждаются только ядра ствола, отвечающие за передачу звуковых раздражителей корковые структуры пропускают лишь речь гипнотизера, игнорируя не только неречевые раздражители, но и речь прочих людей.

Для большей наглядности представим проекции областей четырех основных

базовых состояний на плоскость с осями фокус внимания первой сигнальной системы и уровень возбуждения (рис. 2), а также координат, отражающие фокус внимания второй сигнальной системы и уровень возбуждения (рис. 3).

Принципы и техника измерения уровня неспецифической активности мозга

Наиболее прямыми проявлениями уровня неспецифического возбуждения головного мозга являются его электрическая активность и уровень метаболизма. Рост вклада высокочастотной составляющей, депрессия альфа-ритма ЭЭГ и МЭГ, а также увеличение кровотока, регистрируемого с помощью МРТ и РЭГ, являются прямыми маркерами уровня неспецифического возбуждения мозга. Снятие ЭЭГ и, тем более, МЭГ, на фоне стимулирующего воздействия, на шесть порядков превышающего полезный сигнал, имеющий аналогичный воздействию спектральный состав, является практически невыполнимой задачей. МРТ, в силу дороговизны и практической сложности совмещения со стимуляцией также является не совсем удобным методом диагностики. Таким образом, оптимальным инструментом для диагностики неспецифической активности мозга в условиях транскраниальной нейростимуляции следует признать РЭГ.

Принципы измерения фокуса внимания первой и второй сигнальной системы

Поскольку имеется связь между фокусом внимания первой сигнальной системы и уровнем возбуждения, а также их физиологическими проявлениями, возникает необходимость в разработке методов, позволяющих дифференци-

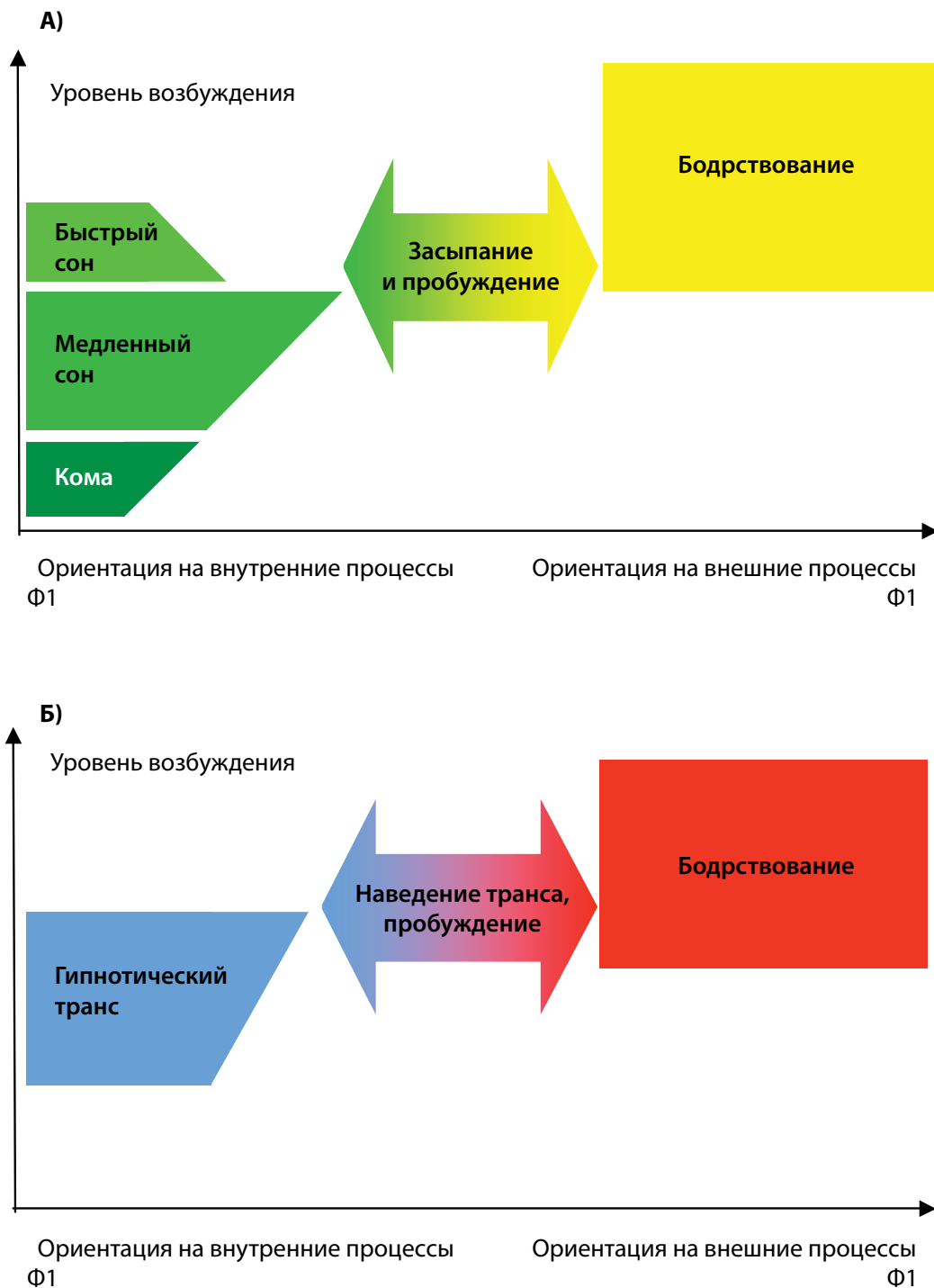


Рис. 2. Проекция областей основных базовых состояний на плоскость с осями фокуса внимания первой сигнальной системы ($\Phi 1$) и уровня возбуждения (УВ). А – фокус внимания второй сигнальной системы ориентирован преимущественно на внешние процессы, Б – фокус внимания второй сигнальной системы ориентирован преимущественно на внутренние процессы.

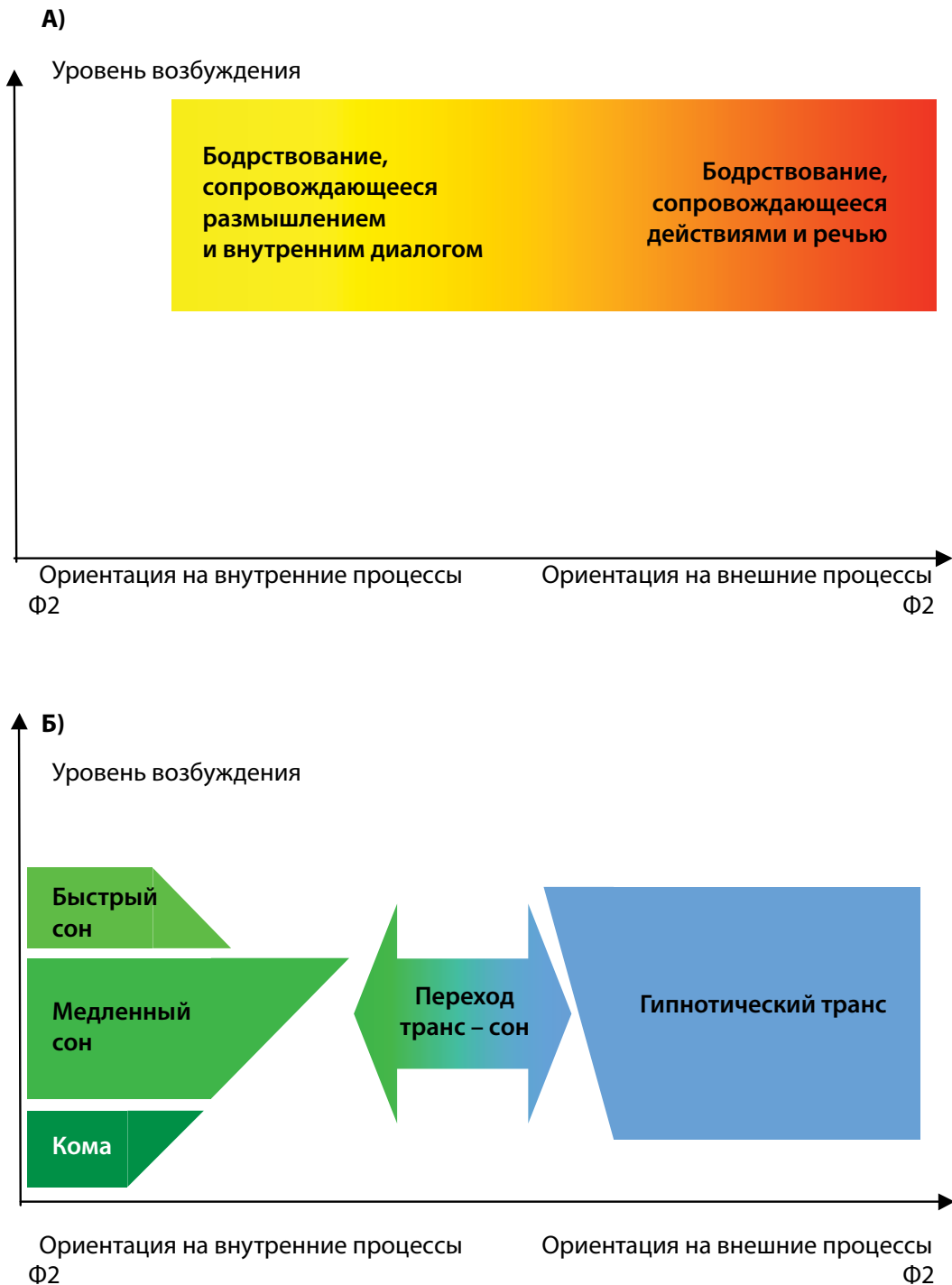


Рис. 3. Проекция областей основных базовых состояния на плоскость с осями фокуса внимания второй сигнальной системы (Ф2) и уровня возбуждения (УВ). А – фокус внимания первой сигнальной системы ориентирован преимущественно на внешние процессы, Б – фокус внимания первой сигнальной системы ориентирован преимущественно на внутренние процессы.

рованно определять уровень возбуждения и фокусы внимания сигнальных систем. Хорошо известно, что восприятие сильного или значимого раздражителя сопровождается изменениями сердечной деятельности и дыхания, сужением периферических сосудов, кожно-гальванической реакцией, явлениями десинхронизации ЭЭГ или уменьшения амплитуды альфа-ритма. Однако аналогичные явления возникают и при увеличении уровня неспецифической активности мозга. В силу того, что нашей задачей является предложение методики измерения именно ориентации фокусов внимания сигнальных систем, необходимо определить, как нужно скорректировать выше описанные маркеры, чтобы исключить из них влияние изменяющегося уровня неспецифической активности мозга.

Для оценки фокуса внимания первой сигнальной системы, связанного в первую очередь с произвольным вниманием к внешним раздражителям, можно взять за основу формулу, упрощенно отражающую функциональную связь амплитуды физиологической реакции с уровнем возбуждения мозга и фокусом внимания первой сигнальной системы:

$$A = UV * \Phi B_1,$$

где A – нормированная на единицу к максимальной, безразмерная амплитуда реакции, UV – нормированный на единицу к максимальному, безразмерный уровень возбуждения, ΦB_1 – фокус внимания первой сигнальной системы.

После тривиального преобразования получаем формулу для определения фокуса внимания первой сигнальной системы:

$$\Phi B_1 = A / UV$$

Для оценки фокуса внимания второй сигнальной системы, связанного в первую очередь с произвольным вниманием, в регулировании которого первостепенное значение имеет речь [6], можно взять за основу формулу, упрощенно отражающую функциональную связь амплитуды физиологической реакции с уровнем возбуждения мозга и фокусом внимания первой и второй сигнальных систем.

$$A = UV * \Phi B_1 * \Phi B_2,$$

где A – нормированная на единицу к максимальной, безразмерная амплитуда реакции; UV – нормированный на единицу к максимальному, безразмерный уровень возбуждения; ΦB_1 – фокус внимания первой сигнальной системы; ΦB_2 – фокус внимания второй сигнальной системы.

После тривиального преобразования получаем формулу для определения фокуса внимания второй сигнальной системы:

$$\Phi B_2 = A / (UV * \Phi B_1)$$

Перспективы применения методов анализа вариабельности сердечного ритма и частоты дыхания для измерения функционального состояния нервной системы в контексте трехмерной векторной модели

Поскольку уровень общей активации мозга, фокусы внимания первой и второй сигнальных систем тесно связаны с уровнем возбуждения стволовых структур, можно предположить, что структуры, управляющие работой сердечно-сосудистой системы и дыханием, могут иметь с ними некоторую связь. В настоящий момент имеются данные, подтверждающие такое предположение [1-5] Однако эти данные не позволяют еще создать методику измерения функ-

ционального состояния нервной системы в контексте трехмерной векторной модели, основанную на методах анализа вариабельности сердечного ритма и частоты дыхания. С этой целью предстоит исследовать корреляции различных характеристик вариабельности сердечного ритма и частоты дыхания, с одной стороны, а также уровня активации мозга и фокуса внимания сигнальных систем, с другой стороны. Здесь важно учитывать также связь таких корреляций с личностными особенностями испытуемых, например, такими как способность к произвольной саморегуляции уровня активации мозга, преобладающей модальности, доминантного полушария и т.д.

Технологии модуляции и диагностики функционального состояния нервной системы

С целью модуляции функционального состояния нервной системы человека нами был создан уникальный программно-аппаратный комплекс «Нейромодулятор», сочетающий транскраниальную динамическую биоуправляемую электрическую (по 24 каналам) и магнитную (по 2 каналам) нейростимуляцию с энцефалографическими и полиграфическими методами диагностики [12]. Были разработаны методы наведения стимуляторов на заданные мозговые структуры [7, 10, 11], методы расчета параметров микрополяризации [8] и методы применения стимуляции для создания гипнотического транса [9].

Список литературы

1. *Бирюкова Е.В.* Регуляция сердечного ритма во время ночного сна у людей юношеского возраста // Автореф. дисс. канд. биол. наук, Тамбов. 2004.
2. *Воронин И.М., Бирюкова Е.В.* Вариабельность сердечного ритма во время сна у здоровых людей. // Вестник аритмологии. 2002. № 30. С. 68-71.
3. *Галкин М., Змиевской Г., Ларюшин А., Новиков В.* Кардиодиагностика на основе анализа фотоплетизмограмм // Фотоника. 2008. № 3. С. 30-35.
4. *Гримак Л.П.* Моделирование состояния человека в гипнозе. – М.:Книжный дом «Либроком». 2009.
5. *Данилова Н.Н.* Психофизиологическая диагностика функциональных состояний. – М. Изд-во МГУ. 1992. 192 с.
6. *Лурия А.Р.* Основы нейропсихологии // – М.Академия. 2007.
7. *Каркищенко Н.Н., Вартанов А.А., Вартанов А.В., Чайванов Д.Б.* Локализация проекции полей Бродмана коры головного мозга человека на поверхность скальпа // Биомедицина. 2011. № 3. С. 40-45.
8. *Чайванов Д.Б., Каркищенко Н.Н.* Математическая модель биофизических процессов при транскраниальной микрополяризации // Биомедицина. 2011. № 3. С. 6-11.
9. *Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Чудина Ю.А.* Перспективы применения биологического управления для повышения эффективности электрической стимуляции мозга // Биомедицина. 2011. № 4. С. 19-30.
10. *Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б., Вартанов А.А.* Выбор оптимальной технологии локализации транскрани-

альных нейростимуляторов на скальпе человека // Биомедицина. 2012. № 1. С. 6-9.

11. Каркищенко Н.Н., Варманов А.А., Чайванов Д.Б. Расчет проекций средних линий извилин и впадин на

поверхность скальпа // Биомедицина. 2012. № 2. С. 105-108

12. Каркищенко Н.Н., Чайванов Д.Б. Аппаратное обеспечение физических методов психотерапии. // Биомедицина. 2012. № 3. С. 6-14.

Three dimension vector model of neuronal system functional condition as theoretical base for condition diagnostic under transcranial electric and magnetic neurostimulation

D.B. Chayvanov, N.N. Karkischenko

The paper considers the physical methods diagnostic of the neuronal system functional condition under transcranial electric and magnetic neurostimulation. As theoretical base are consider the three-dimension vector model of neuronal system functional condition.

Key words: neuronal system functional condition, psychodiagnostic physical methods, electric stimulation, magnetic stimulation.



Обоснование направлений коррекции функционального состояния спортсменов исходя из методологии экстремальных состояний

Е.Б. Шустов, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская обл.

Контактная информация: д.м.н., проф. Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

На основе анализа механизмов формирования экстремальных состояний и сопоставлений с ними закономерностей появления утомления у спортсменов предложены новые подходы к фармакологической коррекции их функционального состояния. Показано, что устранение астенических проявлений и признаков спортивного иммунодефицита, насыщение организма энергодонающими субстратами, расширение резервов систем регуляции организма является необходимым условием эффективной коррекции функционального состояния спортсменов. Особый интерес для фармакологов приобретают регуляторные пептидные соединения и энергодонающие субстраты на основе метаболитов цикла Кребса.

Ключевые слова: утомление, работоспособность, экстремальные состояния, регуляторные пептиды, субстраты энергетического обмена.

В настоящее время в рамках различных направлений медицинской науки (спортивная и военная медицина, медицина труда, авиационная и космическая медицина, медицина экстремальных состояний, фармакология здорового человека, спортивная фармакология) существуют, как минимум, пять принципиально отличающихся взглядов на возможные решения проблемы повышения работоспособности:

- повышение работоспособности как следствие дополнительной стимуляции организма (допинговая фармакология);

- повышение работоспособности как устранение «слабых мест» функциональных систем организма, повышение его неспецифической резистентности (коррекция переносимости воздействия экстремальных нагрузок на организм);
- повышение работоспособности как устранение причин ее снижения (коррекция процессов утомления и механизмов снижения работоспособности);
- повышение работоспособности как ускорение процессов постнагрузочного восстановления;

- повышение работоспособности как адаптация организма к возрастающим физическим нагрузкам (фармакология адаптивных процессов).

Каждый из этих подходов имеет свое научное обоснование и практическую реализацию, в т.ч. путем создания специализированных лекарственных средств и диетических добавок (продуктов функционального, в т.ч. спортивного, питания), комплексных режимов фармакологической поддержки тренировочного или соревновательного процесса, методических рекомендаций, инструкций и наставлений по применению средств фармакологической поддержки.

В основе подхода, реализующего закономерности формирования экстремальных состояний, лежит прямая аналогия между интенсивностью воздействующих на человека нагрузок и развитием при этом у него особых функциональных состояний вплоть до экстремальных (рис. 1).

К экстремальным факторам относят

предельные по переносимости факторы внешней среды человека, в условиях воздействия которых он находится либо в состоянии деятельности, либо в состоянии переживания (поддержания жизнедеятельности на минимальном уровне): высокие или низкие температуры, гипобария, гипербария, измененная дыхательная среда, ультра- и инфразвуки, невесомость и перегрузки, электромагнитные, радиационные, химические и т.д. В последние годы к категории потенциально экстремальных стали относить также факторы информационно-семантического генеза.

Под термином «экстремальные состояния» мы понимаем состояния **предельного напряжения** механизмов адаптации с **обратимыми** явлениями дезадаптации, развивающиеся в ответ на воздействия определенной дозы (интенсивности и длительности) неблагоприятных эколого-профессиональных факторов. Возникновение таких состояний характерно и для практики спорта высших достижений.

Интенсивность нагрузок

Степень экстремальности состояния организма

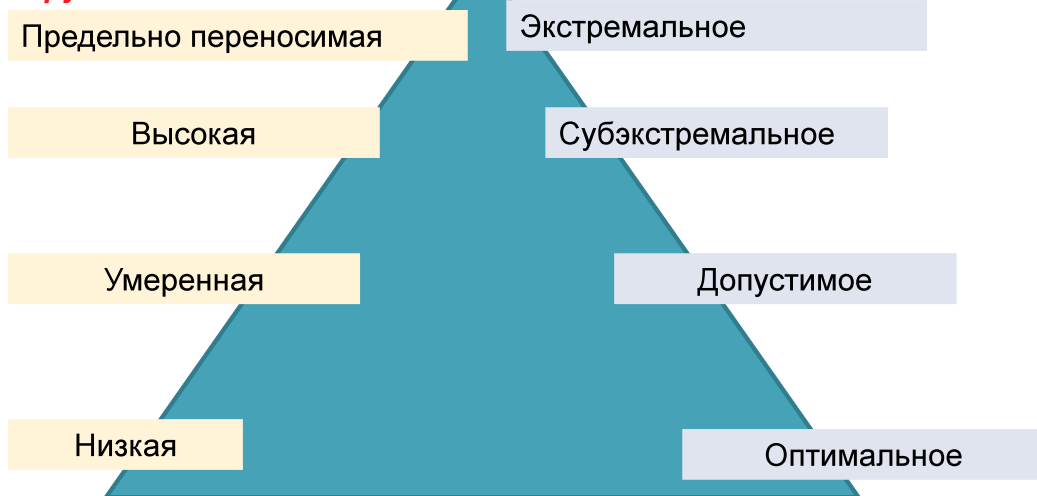


Рис. 1. Сопоставление интенсивности нагрузок и связанных с ними состояний разной степени экстремальности.

При продолжающемся воздействии неблагоприятного фактора экстремальной интенсивности **экстремальное состояние может перейти в критическое**, требующее проведения **реанимационных мероприятий**. Граница между экстремальным состоянием и критическим – **обратимость** проявлений дезадаптации и декомпенсации.

Проведенный анализ механизмов формирования экстремальных состояний [5] у практически здоровых и астенизированных людей в условиях пониженного парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе, высоких и низких температур, значительных физических и нервно-эмоциональных нагрузок (рис. 2) позволяет определить основные направления их коррекции.

К основным направлениям повышения переносимости экстремальных воздействий могут быть отнесены:

- устранение неблагоприятных особенностей исходного функционального состояния – острых или хронических заболеваний, астенических проявлений, нервно-эмоциональной неустойчивости, нарушений иммунитета, вегетативного и нейроэндокринного дисбаланса, дефицита энергетических и пластических нутриентов, витаминов и микроэлементов;
- повышение уровня резистентности к воздействию путем специфической тренировки;
- повышение уровня неспецифической резистентности организма за счет дополнительной витаминизации, закаливания, физической или гипоксической тренировки, психологической подготовки и др.;
- устранение специфических симптомов экстремального состояния, связанных с природой конкретно-

го действующего неблагоприятного фактора;

- профилактика развития или устранение неспецифических синдромов дезадаптации: дефицита функциональных резервов нейроэндокринной регуляции, энергетического дисбаланса, лабилизации клеточных и субклеточных мембран, нарушений антигенно-структурного гомеостаза.

Фармакологическая коррекция функционального состояния может проводиться в трех режимах: упреждающем (профилактическом), текущем и восстановительном. Упреждающая фармакологическая коррекция предназначена для профилактики развития экстремального состояния. Она проводится заблаговременно, в плановом режиме, продолжительность обычно не менее 7-10 дней, в некоторых ситуациях – до месяца. Основные направления упреждающей фармакологической коррекции и используемые для этого фармакологические препараты представлены в таблице.

Текущая фармакологическая коррекция предназначена для устранения специфических симптомов, связанных с экстремальным фактором непосредственно в ходе его действия. Она проводится в экстренном режиме (часы), при недостаточной эффективности упреждающей коррекции, непосредственно в ходе экстремального воздействия. Основные направления текущей фармакологической коррекции связаны с модальностью действующего экстремального фактора (гипоксии, гипероксии, гипотермии, гипертермии, предельных нервных или физических нагрузок). В целях текущей фармакологической коррекции используются различные антигипоксанты (гипоксен, триметазидин, мексидол); антиоксиданты (токоферол, эмокси-

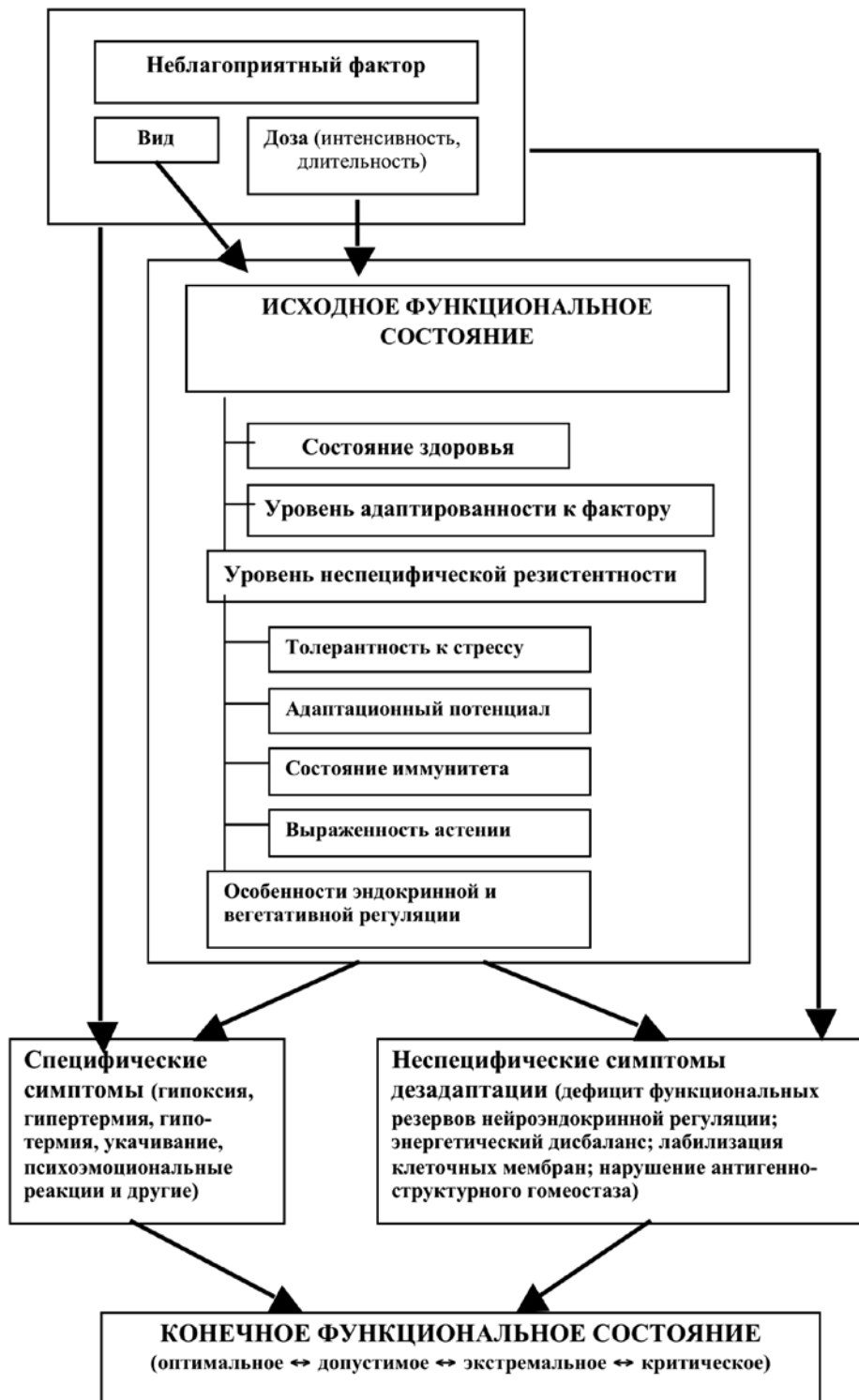


Рис. 2. Механизм формирования экстремальных состояний.

пин); психомоторные стимуляторы (сиднокарб, бромантан); нейропротекторы (пирацетам, кортексин, церебролизин, глицин); дневные транквилизаторы (грандаксин, атаракс, фенибут); фригипротекторы (яктон, актовегин).

Восстановительная коррекция предназначена для устранения возникших обратимых симптомов дезадаптации на этапе срочной реабилитации и проводится после завершения экстремального воздействия, в экстренном или плановом режиме, продолжительностью 5-10 дней. С этой целью могут с успехом применяться по показаниям адаптогены, витамины, микроэлементы, субстраты пластического и энергетического обмена, предшественники медиаторов, биорегуляторные пептиды, иммуностимуляторы, гепатопротекторы, нейропротекторы, снотворные, антиоксиданты, кардиотоники, венотоники, ангиопротекторы, ферментные препараты и эубиотики.

Исходя из особенностей фармакологической коррекции функционального состояния при экстремальных воздействиях и групповой принадлежности, к числу наиболее перспективных для изучения в спортивной фармакологии лекарственных средств могут быть отнесены:

- нейропептиды (Семакс, Селанк, тиролиберины, соматолиберины и их аналоги, Кортексин, Даларгин и др.);
- адаптогены (Жень-шень, Родиола, Лимонник, Панталекс);
- нестероидный анаболический комплекс (витамины, микроэлементы, пуриновые и пиримидиновые производные, аминокислоты);
- энергодающие соединения (углеводы, макроэргические предшественники, органические кислоты цикла Кребса);
- иммуномодуляторы (Тималин, Тимоген, Левамизол, Галавит, Эхинацея и др.);

Таблица

Характеристика направлений упреждающей фармакологической коррекции экстремальных состояний

Направление коррекции	Фармакологическая группа	Представители группы
Улучшение состояния здоровья, лечение хронических заболеваний, профилактика их обострений	Цитамины, поливитаминовые комплексы с минералами и микроэлементами, гепатопротекторы	Бронхоламин, Супренамин, Вазаламин, Корамин, Витрум, Мориамин, Глутамевит, Карсил, Урсосан
Снижение проявлений астении	Ноотропы и психоэнергизаторы, цитомедины, нейропептиды, адаптогены	Пирацетам, Ноопепт, Тонибрал, Ацефен, Кортексин, Эпиталамин, Семакс, Церебролизин, Женьшень, Пантолекс
Стабилизация клеточных мембран	Антиоксиданты, глюкокортикоиды, фосфолипиды, блокаторы кальциевых каналов, антигипоксанты	Токоферол, Гипоксен, Мексидол, Дексаметазон, Лецитин, Верапамил, Триметазидин
Устранение нарушений антигенно-структурного гомеостаза	Адаптогены, иммуномодуляторы, НПВС, пептиды периферического действия, хондропротекторы	Женьшень, Тималин, Плазмол, Тимоген, Вилон, Простатилен, Галавит, Нимесулид, Актовегин, Дона
Устранение дефицита резервов нейроэндокринной регуляции	Адаптогены, нейропептиды, дневные транквилизаторы, глицин, ГАМК-препараты, растительные седативные	Жень-шень, Элеутерококк, Кортексин, Эпиталамин, Семакс, Селанк, Фенибут, Грандаксин, Новопассит
Устранение энергетического дисбаланса	Адаптогены, субстраты энергетического обмена, гемодериваты	Женьшень, сукцинаты, малаты, глицерофосфат, фруктозофосфат, Фитин, Актовегин

- антигипоксанты (Триметазидин, Гипоксен, Мексидол, Актовегин);
- антиоксиданты и ловушки радикалов (Токоферол, Глутатион, др. источники тиолов и селена);
- нейропротекторы и ноотропы (Пирацетам, Ноопепт, Церебролизин, Кортексин, Эпиталамин, Глицин).

Проверка влияния некоторых пептидных препаратов и содержащих их комплексов была выполнена на нескольких моделях оценки работоспособности лабораторных животных (оценка работоспособности у крыс на ротароде и в тесте вынужденного плавания).

В качестве базового пептидного препарата мы использовали Семакс. Семакс – синтетический пептид, созданный на основе фрагмента АКТГ(4-7) с дополнительно включенным в состав трипептидом Pro-Gly-Pro, обеспечивающим защиту от гидролизующего действия пептидаз. Фрагмент АКТГ(4-7) и, соответственно, Семакс, является физиологическим стимулятором памяти. Химическая структура препарата:

H-Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro-OH.

Семакс имеет ряд важных преимуществ перед другими аналогами: полное отсутствие гормональной активности, токсических и побочных влияний, увеличение продолжительности действия более чем в 24 раза по сравнению с природным аналогом, возможность интраназального применения с реальным проникновением в мозг. При интраназальном применении Семакс через 4 мин проникает через гематоэнцефалический барьер; период его полураспада в организме при однократном введении продолжается 20-24 ч [8]. Пролонгированное действие Семакса связано с его последовательной деградацией, при которой большая

часть нейропептида сохраняется у его фрагментов GHFPGP (Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) и HFPGP (His-Phe-Pro-Gly-Pro), также являющихся стабильными нейропептидами, самостоятельно модулирующими холинергическую нейротрансмиссию и генерацию оксида азота [1]. Нейрометаболическое действие Семакса осуществляется за счет ускорения проникновения глюкозы через гематоэнцефалический барьер и повышения скорости ее усвоения клетками различных отделов мозга, увеличения сопряжения окисления и фосфорилирования в митохондриях, что в условиях дефицита кислорода сохраняет высокий уровень образования АТФ, улучшение переносимости гипоксии нервной ткани. Увеличение Семаксом устойчивости организма к гипоксии способствует при хронических заболеваниях ЦНС снижению скорости их прогрессирования и увеличению времени ремиссии болезни.

Первое исследование выполнялось на ротароде. Тест проводился на лабораторных крысах. Выносливость животных тестировалась еженедельно, в течение всего курса введения исследуемого препарата (21 день) и спустя 7 дней после его окончания (следовые эффекты). Каждое животное помещалось в закрытую камеру (30x30x40 см) с отверстиями для воздухообмена. Пол камеры состоял из стальных стержней, на которые подавалось постоянное напряжение 35-40 В. Это вынуждало крысу запрыгивать на вращающийся вал, поднятый на высоту 15 см от пола и покрытый мягким пористым материалом (диаметр вала – 7 см, скорость вращения – 1,5 об./сек) и в течение эксперимента передвигаться на нем [2]. Фиксировалась общая длительность пребывания животного на валу, окончание эксперимента определялось

по снижению выносливости и физической усталости крысы, падающей на электрический пол камеры и не способной подняться на вал снава.

Исследовалось действие пептидного препарата Семакс в дозе 0,22 мг/кг при ежедневном ректальном введении. Через 7 дней после начала эксперимента выносливость животных увеличилась на 12%, через 14 дней – на 23% (+11% по отношению к 7 дню), спустя еще неделю (на 21-й день) она возросла на 263% (+251% по отношению к 7 дню, +240% по отношению к 14 дню), а через неделю после окончания введения – снизилась, составив +189% к фону (+177% по отношению к 7 дню, +166% по отношению к 14 дню и -74% по отношению к 21 дню). У животных контрольной группы выносливость незначительно увеличивалась, что было связано с привыканием животных к стрессам и тренировками (рис. 3).

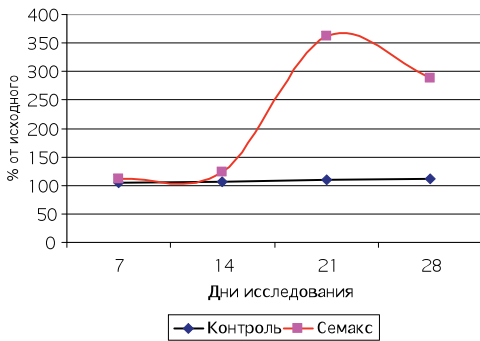


Рис. 3. Динамика адаптации к нагрузкам при применении Семакса.

Так как максимальная эффективность препарата была отмечена в конце его курсового применения (на 21-й день), то для более детального рассмотрения его действия представлены результаты частотного анализа времени срыва работоспособности (продолжительность выполнения теста), характеризующего развитие утомления (рис. 4).

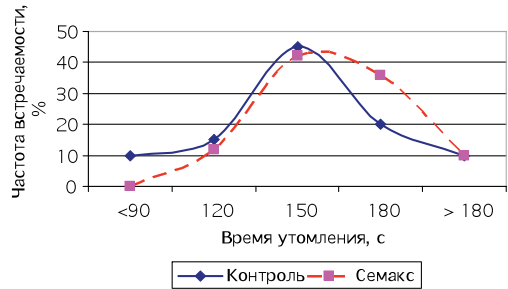


Рис. 4. Развитие утомления крыс в тесте удержания на ротороде.

Из рис. 4 видно, что Семакс способствует перераспределению животных по диапазонам утомляемости (из группы низко устойчивых к утомлению в средний диапазон, со смещением из среднего диапазона устойчивости в группу с повышенной устойчивостью к утомлению). Отмеченное увеличение устойчивости к утомлению при применении Семакса имеет уровень значимости $p=0,1$, то есть находится на уровне статистических тенденций.

С целью повышения эффективности влияния Семакса на физическую работоспособность животных была разработана комплексная рецептура, содержащая Семакс, к которому дополнительно вводились Даларгин и Мексидол.

Даларгин – синтетический гексапептид, аналог лейцинэнкефалина. Было установлено, что, воздействуя на универсальные внутриклеточные пути, нейропептиды оказывают выраженное нормализующее (протекторное) действие на многие системы жизнедеятельности организма человека. Даларгин применяют весьма успешно как компонент антистрессовой защиты во время наркоза в самых различных областях анестезиологии. В настоящее время Даларгин находит себе применение как средство лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Он подавляет

протеолиз и способствует заживлению язв желудка и двенадцатиперстной кишки, обладает умеренной антисекреторной активностью, снижает кислотность желудочного сока. Подавляет внешнюю секрецию пищеварительных ферментов поджелудочной железы в ответ на различные раздражители (в т.ч. пища, секретин). При поражении поджелудочной железы препарат уменьшает гиперферментемию, ограничивает очаги некроза и способствует их замещению полноценной тканью, ослабляет синтез протеолитических ферментов поджелудочной железой. Препарат обладает мягким гипотензивным действием. Форма выпуска – лиофилизат для приготовления инъекционных растворов, по 1 мг в ампулах.

Мексидол – сукцинат-2-этил-3-метил-3-оксипиридин – сочетает антиоксидантные свойства основания (производное 3-оксипиридина) с антигипоксической активностью сукцината [4]. Защитное действие Мексидола проявилось в экспериментах на изолированном сердце крыс. Препарат уменьшал вызванное гипоксией повреждение механической функции сердца, предотвращая при этом падение содержания АТФ, и ускорял восстановление кардиомиоцитов в постгипоксическом периоде. Мексидол повышал устойчивость организма к кислородозависимым патологическим состояниям (шоку, нарушениям мозгового кровообращения), улучшал мнестические функции, снижал токсическое действие алкоголя [6]. Применение препарата в клинической практике связано с такими показаниями как острые нарушения мозгового кровообращения, дисциркуляторные энцефалопатии, вегетососудистая дистония, атеросклероз мозговых сосудов, купирование абстинентного синдрома при алкоголизме и наркомании.

Антигипоксическая активность Мексидола в различных клинически значимых экстремальных состояниях оценивается как умеренная. Мексидол показан при острых нарушениях мозгового кровообращения, дисциркуляторной энцефалопатии, нейроциркуляторной дистонии, легких когнитивных нарушениях атеросклеротического генеза, тревожных расстройствах при невротических и неврозоподобных состояниях. Применяется препарат и для купирования абстинентного синдрома при алкоголизме с преимущественно неврозоподобными нейроциркуляторными нарушениями, при острой интоксикации антипсихотическими средствами, в схемах комплексной терапии острых гнойно-воспалительных процессов в брюшной полости (панкреонекроз, перитонит). Мексидол является также активным антигипоксантом, в первую очередь благодаря антиоксидантной активности. Вместе с тем, в условиях гипоксии препарат вызывает компенсаторную активацию аэробного гликолиза и уменьшает угнетение окислительных процессов в цикле Кребса с повышением содержания АТФ и креатинфосфата, активацией энергосинтезирующей функции митохондрий, стабилизацией клеточных мембран. В присутствии Мексидола отмечена активация сукцинатоксидазного пути окисления, которая в условиях ограничения НАД-зависимого окисления на ранних стадиях гипоксии позволяет сохранить способность цитохромного участка дыхательной цепи к образованию энергии.

Мексидол, как и другие производные янтарной кислоты, в условиях гипоксии, сопровождающей физические нагрузки, оказывает антиоксидантное действие, сохраняет и восстанавливает уровень адениловых нуклеотидов, никотинамид-

ных коферментов, креатинфосфата, стимулирует активность аденилатциклазы, фосфодиэстеразы, ацетилхолинэстеразы, активирует при гипоксии анаэробный гликолиз, способствует восстановлению митохондриальных окислительно-восстановительных процессов, нормализует соотношение холестерол/липопротеины высокой плотности в мембранных структурах, что является весьма существенным для поддержания энергообеспечения и физической работоспособности. В спортивной практике Мексидол (Мексикор) рекомендуется к приему взрослыми спортсменами по 0,125 г 2-4 раза в день, курсами по 2-3 недели [3].

Исследуемые препараты вводились животным ректально, на протяжении 10 дней, в следующих дозах: Семакс – 0,22 мг/кг; Мексидол – 11 мг/кг, Даларгин – 0,56 мг/кг. Тестирование скорости развития утомления проводилось через сутки после последнего введения препарата.

Для проведения теста лабораторным животным в области крестца к шкуре или к задним лапкам прикрепляется груз, пропорциональный весу животного [2, 7]. В зависимости от того, какой режим физических нагрузок (низкий, умеренный, средней или высокой интенсивности) планируется к изучению, выбирается соответствующая масса груза (2,5-3% от массы тела – низкий уровень нагрузок большой длительности; 5% – умеренный уровень нагрузок средней длительности; 7,5% – средний уровень интенсивности нагрузок; 10% – высокий уровень нагрузок, выполнение которых возможно только короткое время). В данном исследовании применялся груз, равный 10% от массы тела. Результаты частотного анализа времени вынужденного плавания крыс представлены на рис. 5.

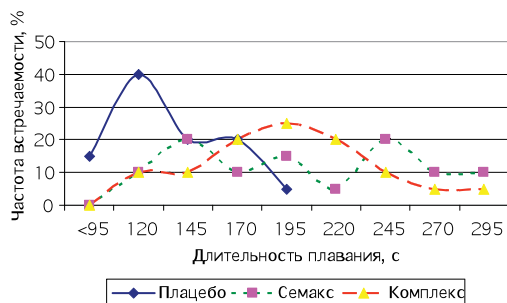


Рис. 5. Развитие утомления у крыс в тесте вынужденного плавания на 11-й день наблюдения под влиянием Семакса и комплексного препарата (Семакс + Мексидол + Даларгин).

Анализ рис. 5 позволяет сделать следующие выводы:

- Семакс и комплексный препарат на его основе существенно влияют на уровень выносливости крыс, увеличивая длительность выполнения ими тяжелых физических нагрузок. При этом эффекты препаратов проявлялись как в снижении доли животных с низкой выносливостью, так и в увеличении доли высоко выносливых животных.
- В отношении высоко выносливых животных более эффективно влияет Семакс.
- Частотная кривая распределения показателя выносливости животных при применении комплексного препарата приближается к виду кривой нормального распределения (в контроле – резко отличается от нее, с демонстрацией признаков экстремальности воздействия). Следовательно, комплексный препарат по своему механизму действия и эффектам компенсирует неблагоприятное экстремальное воздействие тяжелой физической нагрузки на лабораторных животных.

Таким образом, фармакологическая коррекция, основанная на комплексном применении лекарственных средств, в со-

ответствии с концепцией экстремальных состояний, может стать новым подходом к оптимизации функционального состояния и работоспособности спортсменов.

Список литературы

1. Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф., Каменский А.А., Гривенников И.А., Пономарева-Степная М.А., Андреева Л.А., Каплан А.Я., Кошелев В.Б., Рясина Т.В. Ноотропный аналог адренокортикотропина 4-10 - Семакс (15-летний опыт разработки и изучения) // Журнал ВНД. 1997. Т. 47. Вып. 3. С. 420-430.
2. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Казакова Л.Х., Алимкина О.В., Касинская Н.В. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине // Биомедицина. 2012. № 4. С. 15-21.
3. Кулиненко О.С. Фармакология спорта в таблицах и схемах. - М.: Изд-во Советский спорт. 2011. 192 с.
4. Лукьянова Л.Д., Романова В.Е. Особенности антигипоксического действия мексидола, связанные с его специфическим действием на энергетический обмен // Хим. фарм. журнал. 1990. № 8. С. 9-11.
5. Новиков В.С., Горанчук В.В., Шустов Е.Б. Физиология экстремальных состояний. - СПб.: Наука. 1998. 247 с.
6. Смирнов Л.Д., Воронина Т.А. Фармакологическая коррекция гипоксических состояний алкилзамещенными 3-оксипиридинами // Фармакологическая коррекция кислородзависимых состояний. - М. 1984. 87 с.
7. Dawson C., Horvath S. Swimming in small laboratory animals // Med. Sci. Sports. 1970. V. 2. P. 51-78.
8. Potaman V.N., Alfeeva L.Y., Kamensky A.A., Levitskaya N.G., Nezavibatko V.N. N-terminal degradation of ACTH(4-10) and its synthetic analog semax by the rat blood enzymes // BBRC. 1991. V. 176. № 2. P. 741-746.

Justification directions of correction of functional state of athletes according to the basis of the methodology of extreme states

E.B. Shustov, N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko

Based on the analysis of the mechanisms of formation of the extreme conditions and their associated patterns of occurrence of fatigue in athletes new approaches of pharmacological correction of their functional state were suggested. It is shown that the elimination of asthenic signs and symptoms of sports immunodeficiency, saturation of the body giving energy substrates, the expansion of reserves regulation systems of the body is essential to the effective control of the functional state of the athletes. The particular interests to pharmacologists represent regulatory peptide compounds and giving energy substrates on the basis of the Krebs cycle metabolites.

Key words: fatigue, working capacity, extreme conditions, regulatory peptides, energy metabolism substrates.



Адаптационные механизмы защиты обнаженной пульпы у крыс: к вопросу о биомоделировании острого и хронического пульпита

А. Гаджиев¹, А.В. Волков¹, И.И. Бобиченко¹, Е.К. Кречина¹,
Г.Д. Капанадзе², Н.В. Станкова²

¹ – ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Минздравсоцразвития России

² – «ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

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

На лабораторных крысах проводили вскрытие пульпарной камеры передних резцов. По наблюдению в течение 30 суток выявлен ряд адаптационных механизмов в пульпе резцов, которые позволяют ей существовать фактически в виде хронической раны, что не может не отражаться на течении процессов альтерации, воспаления и регенерации, и, в свою очередь, на адекватности полученных результатов при биомоделировании хронического и острого пульпита у грызунов.

Ключевые слова: пульпит, моделирование, лабораторные животные.

Введение

Пульпит, как осложнение кариеса, продолжает занимать одно из лидирующих мест в списке распространенных болезней полости рта, поэтому в научной литературе содержится значительное количество публикаций, посвященных его причине, механизмам, тактике лечения и реабилитации [1-5, 9, 12]. На современном этапе развития биомедицины сложно себе представить разработку и внедрение новых методов лечения таких заболеваний как пульпит в его острой и хронической форме без получения предварительных данных об эффективности этих методов на биомоделях [10].

Как ни странно, но биомоделирование заболеваний и состояний полости рта со-

пряжено с рядом трудностей. В первую очередь, особенности жевания, характер потребления и качество пищи человека практически не сопоставимы с таковыми у животных, служащих биомоделями. Так, например, в литературе встречаются работы по изучению острого и хронического пульпита на плотоядных (собаках) [7], грызунах (кролики, крысы) [6, 8, 13] и парнокопытных [11, 14, 15]. Однако образ питания, биомеханика жевания и даже биоценоз значительно отличаются не только от тех же показателей у человека, но и между собой, что делает полученные в этих моделях результаты не всегда бесспорными.

Так, например, широко распространенная модель пульпита у крыс основана

на обнажении пульпы путем вскрытия пульпарной камеры, предполагающая, что в полученной ране в первые сутки возникнет воспаление и разовьется картина острого пульпита, в последующем переходящего в хроническую форму. Однако в наших наблюдениях выявился ряд адаптационных механизмов у грызунов, позволяющих в той или иной мере противостоять развитию воспаления в пульпе. Как известно, у грызунов резцы стачиваются и отрастают в течение всей жизни, что приводит к постоянной открытой пульпарной камере, но воспаления в резцах, несмотря на это обстоятельство, не происходит.

Материалы и методы

Акклиматизация и отбор животных для исследования. До начала исследования в течение 14 дней происходила адаптация лабораторных животных при групповом содержании в клетках. Во время этого периода ежедневно контролировали клиническое состояние животных путем визуального осмотра.

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 эксперимента, 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 вентилируемых клетках RairIsoSystem по одной особи. В качестве подстилки использовались опилки из нехвойных пород деревьев, прошедшие стерилизацию. Брикетированные 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 профильтрованная вода *ad libitum*. В виварии поддерживались контролируемые условия окружающей среды (температура воздуха – 22-24°C, относительная влажность 60-70%, а также 12-часовой цикл освещения). Никаких существенных отклонений от заданных параметров среды в период акклиматизации и в ходе эксперимента не происходило.

Экспериментальная модель. 20-ти крысам Wistar массой 300-400 г, под комбинированным наркозом (Золетил/Ро-метар) проводили вскрытие пульпарной камеры передних резцов стоматологическим бором на уровне границы слизистой до появления капель крови. Животные были разделены на 4 группы по сроку предполагаемого развития пульпита: первая – 4 суток, вторая – 7 суток, третья – 14 и четвертая – 30 суток. В каждой группе было по 5 животных. Еще 5 крыс были выведены из эксперимента до его начала, с целью определения исходного

состояния пульпы, путем декапитации. Резекция верхних резцов производилась выпиливанием их единым блоком. Нижняя челюсть удалялась и фиксировалась целиком в 10% растворе формалина в течение 72 ч.

Гистологическая проводка и документирование. После отмывки нижние челюсти разделяли на правую и левую половины по средней линии и подвергали декальцинации в трилоне Б в течение 14 дней. После чего проводили через стандартную гистологическую проводку и изготавливали парафиновые блоки. Парафиновые блоки ориентировали плоскостью щечной стороны кверху и изготавливали серийные срезы, проходящие через пульпарную камеру резцов. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Биооптика, Италия). Слайды подвергали микроскопии и документировали с помощью микроскопа Axioplan (Carl Zeiss, Германия).

Результаты исследований

Интактная группа. При гистологическом изучении образцов зубов без воздействия выяснено, что у крыс имеется постоянно открытая пульпарная камера, которая сообщается с внешней средой. Отграничение от которой реализуется за



Рис. 1. Вскрытие пульпарной камеры и обнажение пульпы.

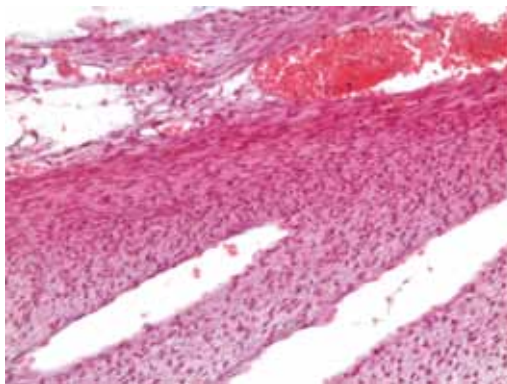


Рис. 2. Гистологическая картина пульпы интактного зуба (резца). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 200.

счет частичной пролиферации одонтобластов и фибробластов соединительной ткани стромы пульпы с образованием двух заметных слоев. Первый, или наружный, представлен сосудистым сплетением и рыхло-волоконистой соединительной тканью, второй – уплотненной

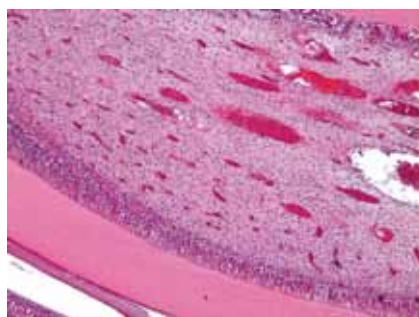


Рис. 3. Гистологическая картина пульпы интактного зуба. Большое количество сосудов артериального и венозного типов, обеспечивающих высокий уровень кровоснабжения. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 100.

тканью стромы пульпы в виде мембраны (рис. 1). Посередине проходит мощный сосудисто-нервный пучок с артериальным и венозным полнокровием (рис. 2).

Группа 4 дня. Через 96 ч после воздействия отмечается артериальное и венозное полнокровие пульпы, отек ее

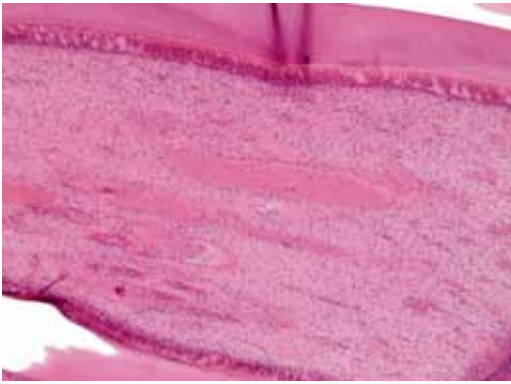


Рис. 4. 96 ч после повреждения пульпы. Отмечается отек стромы и увеличение числа нейтрофилов в сосудах, без феномена «краевого стояния».

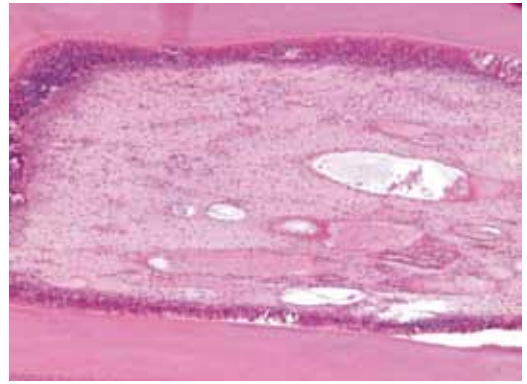


Рис. 5. Отсутствие признаков острого и хронического воспаления через 7 суток после повреждения. Компенсация. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 200.

стромы, появление небольшого количества нейтрофилов в просвете сосудов, без проявления феномена «краевого стояния» (рис. 3).

Группа 7 суток. К этому сроку наблюдения отек стромы отсутствовал, как и любые проявления острого и хронического воспаления (рис. 4), такая же картина сохранялась в группах 14 и 30 суток.

Обсуждение результатов

В описанной модели повреждения резцов у крыс мы выявили, что формирование дополнительного отверстия в резцах не приводит к развитию острого пульпита. В течение первых 4-х дней наблюдения развиваются признаки катарального воспаления в пульпе, которые нивелируются уже к 7-му дню и не переходят в хроническую стадию, продолжающуюся, как минимум, 30 суток. Кроме того, при детальном рассмотрении границы между пульпой и окружающей средой выяснилось, что развитие классического пульпита в резцах практически невозможно в связи с тем, что пульпарная камера всегда открыта и не возникает сдавления сосудов корней нарастающим отеком. В

ответ на повреждение происходит дилатация сосудов с увеличением кровотока. Сохраняющаяся микроциркуляция не создает условий для ишемических и некротических изменений. Строма пульпы и одонтобласты образуют слоистую структуру, которая отграничивает собственно пульпу от внешней среды, формируя, по сути, хроническую компенсированную рану, но без признаков воспаления.

Таким образом, выявлен ряд адаптационных механизмов в пульпе резцов у крыс, которые позволяют ей существовать фактически в виде хронической раны, что не может не отражаться на течении процессов альтерации, воспаления и регенерации, и, в свою очередь, на адекватности полученных результатов при биомоделировании хронического и острого пульпита у грызунов – в частности, у крыс.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг.

Список литературы

1. **Барковский В.С.** // Воспаление пульпы зуба / Иванов В.С. с соавт. – М.: «Медицина». 1990. 51 с.
2. **Григорян А.С.** Морфология и гистохимия пульпы зубов в норме и при воспалении // Стоматология. 1965. № 5. С. 20-27.
3. **Иванов В.С., Винниченко Ю.А., Иванова Е.В.** Воспаление пульпы зуба. – М. МИА. 2002.
4. **Лукиных Л.М., Шестопалова Л.В.** Пульпит: клиника, диагностика и лечение. – Н. Новгород. 2004. 87 с.
5. **Чертыковцев В.Н.** Экспериментально-клиническое обоснование импедансных методов диагностики состояния поврежденной пульпы зуба: Дис. ... д-ра мед. наук. – М. 2002.
6. **Chung M.K., Lee J., Duraes G., Ro J.Y.** Lipopolysaccharide-induced pulpitis up-regulates TRPV1 in trigeminal ganglia // J. Dent. Res. 2011 Sep;90(9):1103-7.
7. **Danesh F., Vahid A., Jahanbani J., Mashhadiabbas F., Arman E.** Effect of white mineral trioxide aggregate compared with biomimetic carbonated apatite on dentine bridge formation and inflammatory response in a dental pulp mode // Int. Endod. J. 2012 Jan;45(1):26-34.
8. **Fried K., Mitsiadis T.A., Guerrier A., Haegerstrand A., Meister B.** Combinatorial expression patterns of the connexins 26, 32, and 43 during development, homeostasis, and regeneration of rat teeth // Int. J. Dev. Biol. 1996 Oct;40(5):985-95.
9. **Gangler P., Hoyer J., Koch I.L.** Pulpitistherapie // Med. Actual. 1984. 3d. 10. № 4. P. 176-178.
10. **Kaan T.K., Ohara P.T., Jasmin L.** Orofacial pain models and behavior assessment // Methods Mol. Biol. 2012;851:159-70.
11. **Kuo T.F., Lin H.C., Yang K.C., Lin F.H., Chen M.H., Wu C.C., Chang H.H.** Bone marrow combined with dental bud cells promotes tooth regeneration in miniature pig model // Artif. Organs. 2011 Feb;35(2):113-21.
12. **Maltz M., Oliveira E., Fontanella V., Carminatti G.** Deep caries lesion after incomplete dentine caries removal: 40-month follow-up study // Caries Research. 2007;41:493-496.
13. **Ohshima H., Nakakura-Ohshima K., Takeuchi K., Hoshino M., Takano Y., Maeda T.** Pulpal regeneration after cavity preparation, with special reference to close spatio-relationships between odontoblasts and immunocompetent cells // Microsc. Res. Tech. 2003 Apr;60(5):483-90.
14. **Yang K.C., Wang C.H., Chang H.H., Chan W.P., Chi C.H., Kuo T.F.** Fibrin glue mixed with platelet-rich fibrin as a scaffold seeded with dental bud cells for tooth regeneration // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2012 Nov;6(10):777-85.
15. **Zheng Y., Wang X.Y., Wang Y.M., Liu X.Y., Zhang C.M., Hou B.X., Wang S.L.** Dentin regeneration using deciduous pulp stem/progenitor cells // J. Dent. Res. 2012 Jul;91(7):676-8.

Adaptation mechanisms of protection pulp exposure in rats: the issue of biomodeling of acute and chronic pulpitis

A. Gadzhiyev, A.V. Volkov, I.I. Bobichenko, E.K. Krechina,
G.D. Kapnadze, N.V. Stankova

In laboratory rats were autopsied pulp chamber front incisors. Observation for 30 days revealed a number of adaptive mechanisms in the pulp cutters that allow it to exist in fact in the form of chronic wounds, which can not affect the current process alterations, inflammation and regeneration, and, in turn, on the adequacy of the results at biomodeling chronic and acute pulpitis in rodents.

Key words: pulpitis, modeling, laboratory animals.

Экспериментальное моделирование хронической сердечной недостаточности

А.А. Казаченко¹, С.В. Оковитый², А.Н. Куликов¹, Д.Ю. Ивкин²,
Е.Б. Шустов³

¹ – Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург

² – Химико-фармацевтическая академия МЗ РФ, Санкт-Петербург

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

Контактная информация: д.м.н., проф. Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

Внедрение новых методов лечения хронической сердечной недостаточности требует адекватной доказательной базы, включающей доклинические исследования на экспериментальных моделях у животных. Проведена успешная апробация нескольких экспериментальных моделей формирования сердечной недостаточности у лабораторных животных, позволяющих с помощью метода эхокардиографии исследовать различные варианты течения заболевания, как по выраженности гемодинамических проявлений, так и по преимущественному поражению отделов сердца.

Наиболее эффективной в плане воспроизводимости и выраженности изменений является модель с перманентным лигированием левой коронарной артерии. Среди фармакологических моделей особенностями доксорубициновой модели хронической сердечной недостаточности является прогрессирующее снижение сократимости миокарда левого желудочка и развитие его эксцентрического ремоделирования, тогда как изадриновая модель характеризуется развитием лишь умеренной сердечной недостаточности, а введение монокроталина вызывает преимущественно развитие легочной гипертензии, гипертрофии правого желудочка и выраженной правожелудочковой сердечной недостаточности.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, моделирование.

Введение

Сердечно-сосудистая патология и, в частности, хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является одной из наиболее серьезных проблем совре-

менной медицины. Внедрение новых методов лечения этой патологии требует достаточной доказательной базы, включающей доклинические исследования на экспериментальных моделях па-

тологии у животных. На сегодняшний день предлагаются различные методы моделирования ХСН у лабораторных животных, однако результативность и информативность этих моделей изучена недостаточно.

Целью настоящего исследования была апробация различных фармакологических моделей ХСН у крыс и оценка их результативности с помощью эхокардиографии (ЭХОКГ).

Материалы и методы

В исследовании использовались самцы лабораторных крыс Wistar массой 200-300 г. Во время проведения эксперимента животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с правилами, утвержденными МЗ СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических вивариев.

Все крысы были разделены на 4 опытные группы. Первая – 7 животных, которым внутрибрюшинно вводили доксорубин (Teva) в кумулятивной дозе 15 мг/кг, разделенной на 6 инъекций в течение 14 дней [9]. Вторая – 12 животных, которым подкожно вводился изопротеренол (изадрин) (Fluka) в дозе 80 мг/кг, дважды с интервалом в 24 ч [1]. Третья – 5 крыс, которым однократно внутрибрюшинно вводили монокроталин (Sigma) в дозе 60 мг/кг [3]. Четвертая – 5 животных, на которых проводилось перманентное лигирование левой коронарной артерии (коронароокклюзия). После наркотизации крыс хлоралгидратом (500 мг/кг, внутрибрюшинно) обрабатывали гортань 2% раствором лидокаина и осуществляли интубацию трахеи. Для проведения искусственной вентиляции легких использовали аппарат ИВЛ (Kent Scientific TORO™ Dual Mode Ventilator; частота ды-

хания – 50/мин, дыхательный объем 1,5-3 мл/ 100 г массы). Доступ к сердцу осуществляли путем торакотомии в четвертом межреберье слева от края тела грудины до передней аксиллярной линии. После рассечения перикарда производили лигирование ствола левой коронарной артерии с помощью атравматической иглы (6-0). Затем производили послойное ушивание раны.

Группу контроля составили интактные животные (по 5 для каждой группы), сопоставимые с исследуемыми по массе и исходным ЭХОКГ-показателям.

На животных с фармакологически моделями ХСН ЭХОКГ выполнялась трижды: исходно (1-я точка), через 1 мес. (2-я точка) и через 2 мес. (3-я точка) после моделирования ХСН. На животных четвертой группы ЭХОКГ выполнялась дважды: исходно (1-я точка) и через 6 недель (2-я точка).

ЭХОКГ выполнялась с использованием ультразвуковой системы «Acuson Sequoia 512» с линейным датчиком (частота 8МГц). Исследование животных проводили под тиопенталовым наркозом (60 мг/кг). В М-режиме (рис. 1) регистрировали: диаметр аорты у корня (Ао, мм); передне-задний размер левого предсердия (ЛП, мм); конечные диастолический и систолический размеры левого желудочка (КДР, КСР, мм); толщину межжелудочковой перегородки (Тмжп, мм) и толщину задней стенки левого желудочка (Тзс, мм); частоту сердечных сокращений (ЧСС). В В-режиме (рис. 2): поперечные и вертикальные размеры левого и правого желудочков, левого и правого предсердий (ЛЖп, ЛЖв, ПЖп, ПЖв, ЛПп, ЛПв, ППп, ППв, мм). Рассчитывали: конечный систолический и диастолический объемы (КСО, КДО, мл), показатели сократимости левого желудочка (ЛЖ)

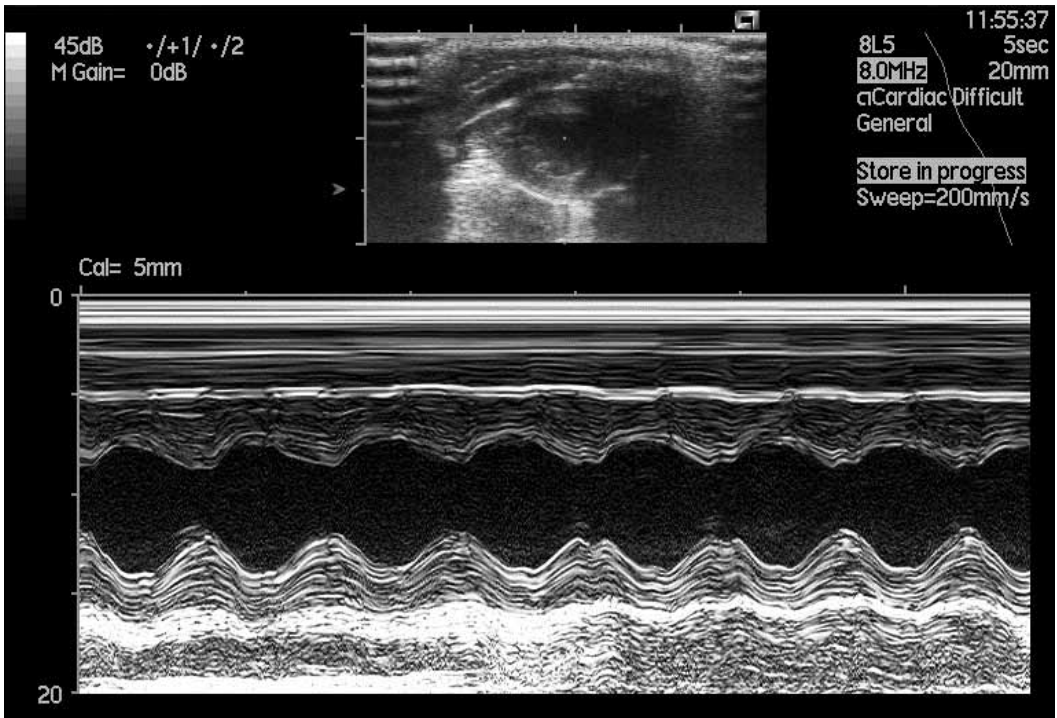


Рис. 1. ЭХОКГ сердца животных в М-режиме.

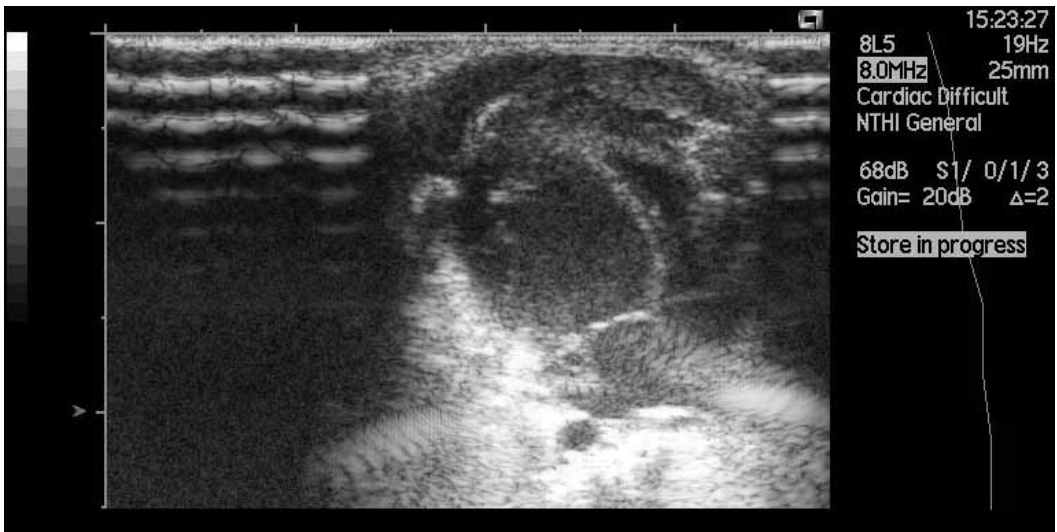


Рис. 2. ЭХОКГ сердца животных в В-режиме.

– фракцию укорочения ($\text{ФУ} = (\text{КДР} - \text{КСР}) / \text{КДР} \cdot 100; \%$) и фракцию выброса ($\text{ФВ} = (\text{КДО} - \text{КСО}) / \text{КДО} \cdot 100; \%$) по Teichholz (1976), ударный объем (УО); показатели ремоделирования ЛЖ – относительную толщину миокарда ($\text{ОТМ} = (\text{Тмжп} + \text{Тзс}) / \text{КДРЛЖ}, \text{ед}$).

Результаты и их обсуждение

За период наблюдения у интактных животных на фоне естественного развития отмечалось достоверное увеличение средней массы тела, при ЭХОКГ – увеличение размеров камер сердца, пропорциональное увеличению массы тела, при неизменных показателях сократимости и ремоделирования левого желудочка (ФУ, ФВ, ОТМ).

У животных 1-й опытной группы (доксорубициновая модель ХСН) отсутствовал прирост массы тела и даже отмечалась тенденция к снижению к 3-й точке наблюдения. Через 1 мес. после введения доксорубицина наблюдались признаки эксцентрического ремоделирования миокарда ЛЖ, характеризующиеся увеличением КДР, значимым в сравнении с контролем уменьшением ОТМ. К третьей точке наблюдения наблюдалось увеличение размеров левого желудочка (КДР, ДКО), значимое в сравнении с контрольной группой снижение показателей сократимости (КСР, ФУ, ФВ), уменьшение ОТМ. Смертность в данной группе составила 30% к концу наблюдения (2 из 7 животных), стойкое снижение сократимости наблюдалось у всех выживших крыс.

Во 2-й группе (изадриновая модель ХСН) через 1 мес. была отмечен достоверный прирост массы, наблюдалось увеличение размеров левого желудочка, с достоверным снижением показателей сократимости (КСР, ФУ и ФВ) и уменьшением ОТМ. К 8-й неделе наблюдения (3-я точка) отмечался дальнейший рост животных с достоверным приростом массы тела и некоторым увеличением размеров камер сердца, отмечалась тенденция к улучшению сократимости левого желудочка. При сравнении с контролем значимо большим оказался лишь диаметр

аорты. Все животные данной группы выжили, к 8-й неделе стойкое снижение сократимости левого желудочка наблюдалось лишь у 17% (2 из 12 крыс).

У крыс 3-й опытной группы (монокроталиновая модель ХСН) через 1 мес. наблюдения значимых различий с группой контроля выявлено не было. У животных отмечалась тенденция к увеличению массы тела и значимое увеличение ЛП. Через 2 мес. наблюдения при сравнительном анализе с контролем различались лишь в меньших величинах диаметра аорты, КДР, КДО и УО. Между тем, следует отметить, что у 2-х животных, получавших монокроталин, к 8-й неделе наблюдения отмечено выраженное уменьшение массы тела, причем у 1-го животного потеря массы составила 40% (2-я точка – 248 г, 3-я точка – 155 г). При ЭХОКГ наибольшие изменения отмечались со стороны правых отделов сердца. У обоих животных выявлялась резкая гипертрофия стенок правого желудочка (до 2 мм), парадоксальное движение межжелудочковой перегородки, увеличение КСР (4,2 и 4,5 мм соответственно), снижение ФУ (35,1% и 28,2% соответственно) и ФВ (70,2 и 60,2% соответственно). Кроме того, у крысы с выраженным дефицитом массы тела была обнаружена выраженная дилатация правого предсердия (ППв и ППп в 2,5 раза больше средних показателей в контрольной группе – 10,2 и 5,4 мм против $4,3 \pm 0,5$ мм и $3,2 \pm 0,5$ мм соответственно) и тяжелая трикуспидальная регургитация. Смертности в данной группе к концу наблюдения не отмечалось.

Наиболее выраженные изменения наблюдались в 4-й группе. Через 6 мес. после выполненной коронароокклюзии у всех животных отмечался прирост массы тела (более выраженный по срав-

нению с другими группами), дилатация всех камер сердца, истончение стенок ЛЖ и уменьшение ОТМ, снижение глобальной сократимости миокарда. У большинства крыс отмечались признаки очагового кардиосклероза и нарушение локальной сократимости. При сравнении с контрольной группой значимо различались КДО, КСО, ФВ. Выявленные изменения наблюдались у всех животных данной группы, смертельных исходов не было.

Таким образом, на всех использованных моделях выявлены нарушения сократительной функции сердца с формированием ХСН, но степень выраженности значительно различалась. Наиболее воспроизводимыми моделями оказались введение доксорубина и перманентное лигирование левой коронарной артерии, причем последнее приводило к более выраженным изменениям. Именно перевязка коронарных артерий, на наш взгляд, является наиболее оптимальным вариантом моделирования ХСН, но требует более сложной технической подготовленности, что может существенно ограничить ее использование.

Высокая летальность в первой группе, по всей видимости, объясняется дозозависимой кардиотоксичностью доксорубина [5]. Данные других авторов о гастроинтестинальной и общей токсичности препарата при внутрибрюшинном введении [8] отчасти объясняют дистрофию животных, так как только в данной группе к концу наблюдения отмечалось снижение массы тела. При этом объяснение данного факта влиянием ХСН кажется маловероятными. С одной стороны, период наблюдения был не достаточно большим, а с другой – в четвертой группе, где снижение сократимости было максимальным, прирост массы тела был наибольшим.

Последнее легче объяснить застойными явлениями на фоне ХСН. В целом, из всех апробированных нами фармакологических моделей доксорубиновая вызывает наиболее прогнозируемое развитие выраженной и прогрессирующей ХСН у большинства животных, что согласуется с результатами работ других авторов [2, 6]. По нашему мнению, использование доксорубиновой модели для оценки различных методов лечения ХСН представляется наиболее интересным.

Оставшиеся две фармакологические модели представляют меньший интерес в плане оценки течения именно ХСН. Так, введение изопротенерола приводило к выраженным изменениям лишь во 2-й точке наблюдения, проявляющимся снижением ФВ и тенденцией к истончению стенок ЛЖ. К 3-й точке отмечалась стабилизация размеров и сократимости ЛЖ, с некоторой тенденцией к ее улучшению. Такая динамика показателей сократимости и ремоделирования ЛЖ позволяет предположить, что введение изопротенерола вызывает компенсированную ХСН и лучше подходит для моделирования не столько хронической, сколько острой сердечной недостаточности.

Введение монокроталина в целом по группе не вызывало снижения сократимости ЛЖ. Наблюдаемые изменения у двух животных в виде выраженной гипертрофии и дилатации правых отделов сердца свидетельствовали о развитии у них вторичной легочной гипертензии. Отрицательная динамика массы тела у них же, вероятно, была обусловлена развитием сердечно-легочной недостаточности. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, свидетельствующими о начале формирования легочной гипертензии, индуцирующей развитие гипертрофии правого же-

лудочка к 10-15 суткам после введения монокроталина [7, 10]. При этом критическими считаются первые 2 мес., когда отмечается максимальная летальность. В последующем у животных, адаптировавшихся к развившейся легочной гипертензии, продолжительность жизни может быть достаточно большой, а мор-

фофункциональные изменения сердца длительное время минимальны [4, 7, 10]. Таким образом, введение монокроталина приводит к развитию у части животных вторичной легочной гипертензии с формированием хронического легочного сердца и правожелудочковой сердечной недостаточности.

Таблица 1

Динамика ЭХОКГ-показателей в 1-й и 4-й опытных группах

Показатели	Доксорубин			Коронароокклюзия	
	исходно	4 недели	8 недель	исходно	6 недель
Масса, г	227±30,5	234±23,8	212±11,5 ^{..}	252,6±15,5	419±52,3 ¹
Аорта, см	0,35±0,04	0,35±0,03	0,35±0,2	0,32±0,04	0,39±0,03 ¹
ЛП, см	0,35±0,05	0,45±0,04	0,47±0,5 ¹	0,28±0,03	0,38±0,08 ¹
КДР лж, см	0,56±0,05	0,68±0,06 ¹	0,69±0,04 ¹	0,61±0,06	0,89±0,1 ¹
КДО лж, мл	0,42±0,13	0,71±0,17 ¹	0,74±0,13 ¹	0,56±0,14	1,5±0,4 ¹
КСР лж, см	0,28±0,06	0,4±0,09	0,45±0,05 ¹	0,28±0,04	0,74±0,11 ¹
КСО лж, см	0,07±0,04	0,18±0,1	0,24±0,07 ¹	0,1±0,04	0,97±0,35 ¹
ОТМ, ед.	0,49±0,05	0,41±0,02 [*]	0,37±0,03 ^{1,2}	0,46±0,08	0,32±0,08 ¹
ФУ, %	51,2±6,4	40,9±8,3	34,3±4,51 ^{**,}	47,7±3,5	16,4±5,3 ¹
УО, мл	0,36±0,09	0,53±0,08 ¹	0,51±0,07 ^{**}	0,43±0,11	0,56±0,16 ¹
ЧСС, уд/мин	440±77	457±36 [*]	413±42 ²	428±35	355±84 ¹
ФВ %	86,3±5,1	76,3±9,1	68,9±5,9 ¹	83,6±4,2	38,4±10,3 ¹

Примечание: здесь и в табл. 2 данные представлены в виде М±m, где М – среднее арифметическое значение показателя группы, m – среднев квадратическое отклонение. В надстрочном индексе: 1 – p<0,05 в сравнении с исходными показателями; 2 – p<0,05 в сравнении с показателями 2-й точки; * – p<0,05 в сравнении со 2-й точкой интактных животных; ** – p<0,05 в сравнении с 3-й точкой интактных животных.

Таблица 2

Динамика ЭХОКГ-показателей во 2-й и 3-й опытных группах

Показатели	Монокроталин			Изопротеренол		
	исходно	4 недели	8 недель	исходно	4 недели	8 недель
Масса, г	220±33	263±36 ¹	300±41 ^{1,2}	220±33	263±36 ¹	300±41 ^{1,2}
Аорта, см	0,32±0,04	0,36±0,04 ¹	0,4±0,03 ^{1,2}	0,32±0,04	0,36±0,04 ¹	0,4±0,03 ^{1,2}
ЛП, см	0,34±0,07	0,43±0,05 ¹	0,43±0,04 ¹	0,34±0,07	0,43±0,05 ¹	0,43±0,04 ¹

КДР лж, см	0,59±0,11	0,7±0,04 ^{1,2}	0,7±0,05 ¹	0,59±0,11	0,7±0,04 ^{1,2}	0,7±0,05 ¹
КДО лж, мл	0,54±0,24	0,78±0,14 ^{1,2}	0,79±0,15 ¹	0,54±0,24	0,78±0,14 ^{1,2}	0,79±0,15 ¹
КСР лж, см	0,31±0,07	0,42±0,06 ^{1,2}	0,41±0,05 ¹	0,31±0,07	0,42±0,06 ^{1,2}	0,41±0,05 ¹
КСО лж, см	0,09±0,06	0,19±0,08 ^{1,2}	0,18±0,09 ¹	0,09±0,06	0,19±0,08 ^{1,2}	0,18±0,09 ¹
ОТМ, ед.	0,54±0,12	0,41±0,06 ^{1,2}	0,4±0,04 ¹	0,54±0,12	0,41±0,06 ^{1,2}	0,4±0,04 ¹
ФУ, %	47,7±6,9	39,9±6,6 ^{1,2}	41,7±6,3 ¹	47,7±6,9	39,9±6,6 ^{1,2}	41,7±6,3 ¹
УО, мл	0,45±0,2	0,59±0,11 ¹	0,61±0,14 ¹	0,45±0,2	0,59±0,11 ¹	0,61±0,14 ¹
ЧСС, уд/мин	343±94	382±66 ¹	332±47	343±94	382±66 ¹	332±47
ФВ %	83,4±5,6	75,2±7,7 ^{1,2}	77,4±6,4 ¹	83,4±5,6	75,2±7,7 ^{1,2}	77,4±6,4 ¹

Выводы

1. Наиболее эффективной по воспроизводимости и по выраженности изменений является модель с перманентным лигированием левой коронарной артерии.

2. Особенности доксорубициновой модели хронической сердечной недостаточности являются прогрессирующее снижение сократимости миокарда левого желудочка и развитие его эксцентрического ремоделирования.

3. Изадриновая модель характеризуется развитием лишь умеренной сердечной недостаточности, а введение монокроталина вызывает преимущественное развитие легочной гипертензии, гипертрофии правого желудочка и выраженной правожелудочковой сердечной недостаточности.

4. Эхокардиография (ЭХОКГ) является высокоинформативным неинвазивным методом оценки в динамике сердечно-сосудистой системы у мелких животных при моделировании различной патологии.

Список литературы

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Ремедиум. 2005. 829 с.
2. *Christiansen S., Redmann K., Scheld H.H., et al.* Adriamycin-induced cardiomyopathy in the dog – an appropriate model for research on partial left ventriculectomy // *J. Heart Lung Transplant.* 2002. Vol. 21. № 7. P. 783-790.
3. *Elsner D., Riegger G.A.J.* Characteristics and clinical relevance of animal models of heart failure /D. Elsner // *Curr Opin Cardiol.* 1995. Vol. 10. № 3. P. 253-259.
4. *Gram T.E.* Metabolic activation and toxicity of chemical agents to lung tissue and cells / Pergamon Press, Oxford. 1993. P. 239-254.
5. *Lee V., Randhawa A.K., Singal P.K.* Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals // *Am J. Physiol.* 1991. Vol. 261. № 4. Pt. 4. P. 989-995.

6. **Monnet E., Orton E.C.** A canine model of heart failure by intracoronary adriamycin injection: hemodynamic and energetic results // *J. Card. Fail.* 1999. Vol. 5. № 3. P. 255-264.
7. **Robinovitch M.** Investigational approaches to pulmonary hypertension // *Toxicol. Pathol.* 1991. Vol. 19. № 4. Pt. 1. P. 458-469.
8. **Toyoda Y., Okada M., Kashem A.M.** A canine model of dilated cardiomyopathy induced by repetitive intracoronary doxorubicin administration // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1998. Vol. 115. № 6. P. 1367-1373.
9. **Weinberg L.E., Singal P.K.** Refractory heart failure and age-related differences in adriamycin-induced myocardial changes in rats // *Can J. Physiol. Pharmacol.* 1987. Vol. 65. № 9. P. 1957-1965.
10. **Wilson D.W., Segall H.J., Pan L.C., et al.** Mechanisms and pathology of monocrotaline toxicity // *Crit. Rev. Toxicol.* 1992. Vol. 22, № 5. P. 307-325.

Experimental modeling of chronic warm insufficiency

A.A. Kazachenko, S.V. Okovityy, A.N. Kulikov, D.Yu. Ivkin, E.B. Shustov

Introduction of new methods of treatment of chronic warm insufficiency demands the adequate evidential base including preclinical researches on experimental models at animals. Successful approbation of several experimental models of formation of warm insufficiency at the laboratory animals allowing by means of a method of an echocardiography to investigate various options of a course of a disease, both on expressiveness of hemodynamic manifestations, and on primary defeat of departments of heart is carried out.

The most effective in terms of reproducibility and intensity of the changes is the model with a permanent ligation of the left coronary artery. Among the features of pharmacological models doxorubicin model of chronic heart failure is a progressive decrease in left ventricular contractility and the development of his eccentric remodeling, whereas izadrin model is characterized by the development of a moderate heart failure, and the introduction of monocrotaline is mainly the development of pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy and severe right heart failure.

Key words: chronic heart failure, modeling.

Бактериальный меланин как ускоритель восстановления моторики после повреждения кортико-руброспинальной системы двигательного контроля

Т.Р. Петросян¹, О.В. Геворгян²

¹ – Армянский государственный институт физической культуры, кафедра кинезиологии

² – Институт физиологии Национальной академии наук Армении, Ереван

Контактная информация: Петросян Т.Р., tigpetrosyan@mail.ru

Одностороннее разрушение руброспинального тракта у крыс после предварительной выработки инструментального условного рефлекса (ИУР) вызывает гемипарез конечностей противоположной стороны. На следующий день после операции половине оперированных животных вводили внутримышечно раствор бактериального меланина (БМ). Сравнение сроков восстановления ИУР и балансирующего движения парализованной задней конечности у крыс контрольной группы и животных, получавших меланин, показало, что срок посттравматического восстановления намного короче у животных последней группы. Такое ускорение восстановительного процесса является результатом протекторного влияния БМ и облегчения процесса переключения нисходящего регулирующего воздействия от руброспинальной к кортикоспинальной системе. Морфогистохимическое исследование показало, что БМ способствует спраунтингу нервных волокон и регенерации в нервной ткани.

Ключевые слова: инструментальный условный рефлекс, руброспинальный тракт, бактериальный меланин, посттравматическое восстановление, морфогистохимическое исследование.

Введение

Руброспинальная система является одним из нисходящих проекционных путей, который контролирует спинальные моторные нейроны. Использование всех конечностей соответствует тому периоду развития у животного, когда руброспинальный тракт устанавливает контакты со спинальными нейронами [5]. Совершенствование точностных движений связано со связями латерального мозжечка, с корой мозга и мелкоклеточной части красного ядра (КЯ) [11]. Эта проекционная система филогенетически предшествуют возникновению моторной коры и пирамидного тракта. КЯ на этом этапе представляет основную структуру для

координации мозжечковых и корковых посылок для контроля движений [14].

Исследованиями, проведенными методом повреждения кортикоспинального и руброспинального трактов, показано, что при организации движений эти тракты взаимно заменяют друг друга, а их функции сходны при регуляции скорости, силы и времени подключения движения. Переключение функций между этими трактами является основным механизмом восстановления нарушенных движений, наступающих после травмы каждого из них [12]. Но такое восстановление у взрослого животного бывает затяжным и неполным, особенно если не проводятся терапевтические мероприятия.

Настоящее исследование было проведено как продолжение работ, выполняемых в предыдущие годы, в которых после травмы некоторых структур ЦНС, участвующих в организации двигательной деятельности организма крыс, исследовалось влияние бактериального меланина на процесс посттравматической реабилитации [1, 3]. В работе представлены результаты влияния введения бактериального меланина на восстановление инструментальных рефлексов и балансирующего движения задней конечности после одностороннего разрушения руброспинального тракта у крыс.

Бактериальный меланин был получен в Институте биотехнологии РА из мутантного штамма *Bacillus thuringiensis*. Физико-химическими исследованиями было установлено, что этот пигмент является меланином [7]. Были проведены исследования по изучению физиологической активности бактериального меланина на животных моделях травматической нейродегенерации [3].

Материалы и методы

Работа выполнена на белых нелинейных крысах ($n=12$) в возрасте 2-3 мес., массой 200-250 г.

У всех животных заранее вырабатывался инструментальный рефлекс на равновесие, при котором они балансировали на медленно вращающемся (9 об./мин) горизонтальном бруске 250 сек, в течение которых крысы сохраняли постоянную позу и равновесие тела благодаря попеременному переставлению задних лап. Животных тестировали 10 раз в день, а интервал между тестами составлял 60 сек. После выработки прочного инструментального рефлекса под нембуталовым наркозом (40 мг/кг), на уровне верхних шейных сегментов (С3-4) унилатерально

разрушали руброспинальный тракт [13]. Разрушение приводило к парезу гомолатеральных конечностей.

Половине оперированных крыс ($n=6$) на следующий день после операции в/м вводили раствор бактериального меланина в концентрации 6 мг/мл, из расчета 170 мг/кг оперированных животных. Другая половина животных ($n=6$) служила контролем.

Через день после введения меланина всех оперированных животных брали на тестирование для возобновления выработки инструментального рефлекса до окончательного его восстановления.

Для изучения влияния БМ было проведено морфогистохимическое исследование срезов спинного мозга. Был использован гистохимический метод для выявления активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы [4].

Результаты исследований

После операции клинические симптомы были выражены в первые 2 суток. Крысы ходили медленно, задняя лапа на стороне операции значительно отставала, часто они ее влачили по полу, четко виден был дефект флексии. До достижения нормального уровня выработки рефлекса животные не способны были долго продержаться на вращающемся бруске, быстро переворачивались и падали намного раньше положенного срока. Статистическая обработка данных показала, что инструментальный рефлекс у интактных крыс вырабатывался, в среднем, за $1,75 \pm 0,3$ суток, который у животных контрольной группы после возобновления выработки в постоперационный период восстановился, в среднем, за $13,7 \pm 1,3$ суток. У получивших после операции раствор бактериального меланина животных инструментальный

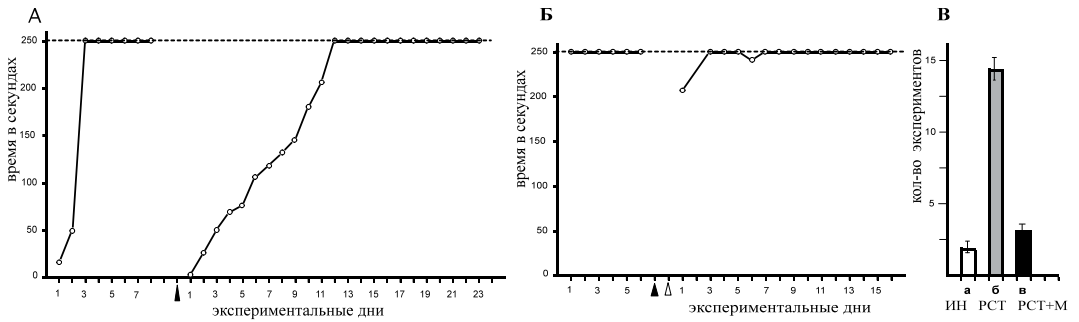


Рис. 1. А – динамика выработки инструментального рефлекса (левая часть графика) и его восстановление (правая часть графика) после унилатерального разрушения руброспинального тракта (темный треугольник под осью абсцисс). По оси абсцисс – дни экспериментов, по оси ординат – среднее время нахождения животного на вращающемся бруске при 10 испытаниях. Штриховая горизонтальная линия на 250 с – критерий выполняемости рефлекса. Б – обозначения те же, что и на рис. А, светлым треугольником под осью абсцисс обозначен день введения раствора бактериального меланина. В – гистограмма (а) среднего времени выработки инструментального рефлекса у интактных животных (ИН), (б) – среднего времени восстановления инструментального рефлекса после разрушения руброспинального тракта, (в) – среднего времени восстановления инструментального рефлекса после разрушения руброспинального тракта и введения раствора бактериального меланина (PCT+M).

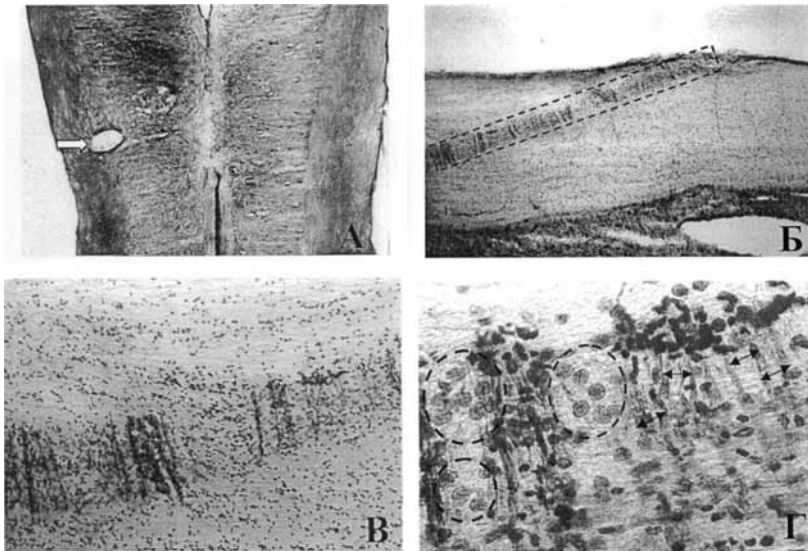


Рис. 2. А – горизонтальный срез спинного мозга контрольных крыс с перерезкой руброспинального тракта (место перерезки указано белой стрелкой); Б, В – горизонтальный срез спинного мозга крыс с перерезкой руброспинального тракта, получивших раствор бактериального меланина в/м в концентрации 6 мг/мл; Г – фрагмент Б в прямоугольнике (черные стрелки указывают на нервные волокна, в кружочках показаны зернистые тельца). Выявление активности Ca^{2+} – зависимой кислой фосфатазы. Увеличение: ок. 10, об. 2,5 (А); 6,3 (Б); 40 (Г).

рефлекс восстановился, в среднем, за $2,7 \pm 0,5$ суток.

Сравнение этих результатов показало, что у получивших меланин животных:

1) срок выработки инструментального рефлекса после операции укорачивается в несколько раз по сравнению с контрольными животными;

2) выработка рефлекса и восстановление движения происходят почти одновременно;

3) постоперационная реабилитация у таких крыс бывает полной, а поведение не отличается от нормальных.

Восстановление балансирующего движения задней парализованной конечности на стороне операции у контрольных крыс является подтверждением факта переключения функции между руброспинальным и кортикоспинальным трактами. В случае введения меланина это произошло почти одновременно с восстановлением инструментального рефлекса. Такое быстрое восстановление, по-видимому, обусловлено как протекторным действием меланина, так и маленьким размером травмы по сравнению с кортикоспинальным трактом. Приведенные выше результаты подтверждаются данными морфо-гистохимического исследования срезов спинного мозга [4].

Срезы мозга делались продольными (рис. 2), чтобы проследить ход волокон перерезанного участка руброспинального тракта. У контрольных животных без меланина в участке травмы наблюдается картина полной демиелинизации, прогрессирующая пролиферация ядер глиальных клеток, которая почти завершена по окончании эксперимента. Нервные клетки набухшие, их отростки и ядра не выявляются. Совершенно другая картина наблюдается у получивших меланин животных, у которых на срезах травмированного участка

спинного мозга четко видно усиление васкуляризации (рис. 2Б, В), вследствие чего повышается трофика нервной ткани, благоприятствующая регенерации и подавлению процесса образования астроглиального рубца, а также предопределяет интенсивность коллатерального спраутинга, пролиферации, дифференциации и формирования новых клеточных элементов. На рис. 2Г отчетливо видно в межклеточном пространстве множество зернистых телец круглой или овальной формы, которые также являются благоприятствующими факторами для выживания клеточных элементов, так как в связи с усилением нормального обмена увеличиваются продукты расщепления, которые быстро захватываются ими. На этом кадре между ядрами глиальных клеток виден ход нервных волокон, отмеченный черными стрелками. В наших предыдущих исследованиях с введением бактериального меланина были получены аналогичные результаты [1, 3]. Известно, что у зрелого организма млекопитающих регенерация аксонов в ЦНС после травмы затруднена по причине наличия в миелине тормозящих рост факторов, которые сильно подавляют способность роста волокон [15]. В то же время не отрицается, что с помощью блокады рецепторов этих тормозящих протеогликанов в нервной системе создаются условия для регенерации и коллатерального спраутинга кортикоспинальных волокон спинного мозга, а также улучшается локомоторная функция [15].

Показано, что использование нейротрофических факторов может предотвратить атрофию аксономированных год назад нейронов руброспинального тракта.

Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что бактериальный меланин проявляет протекторные свойства предотвращени-

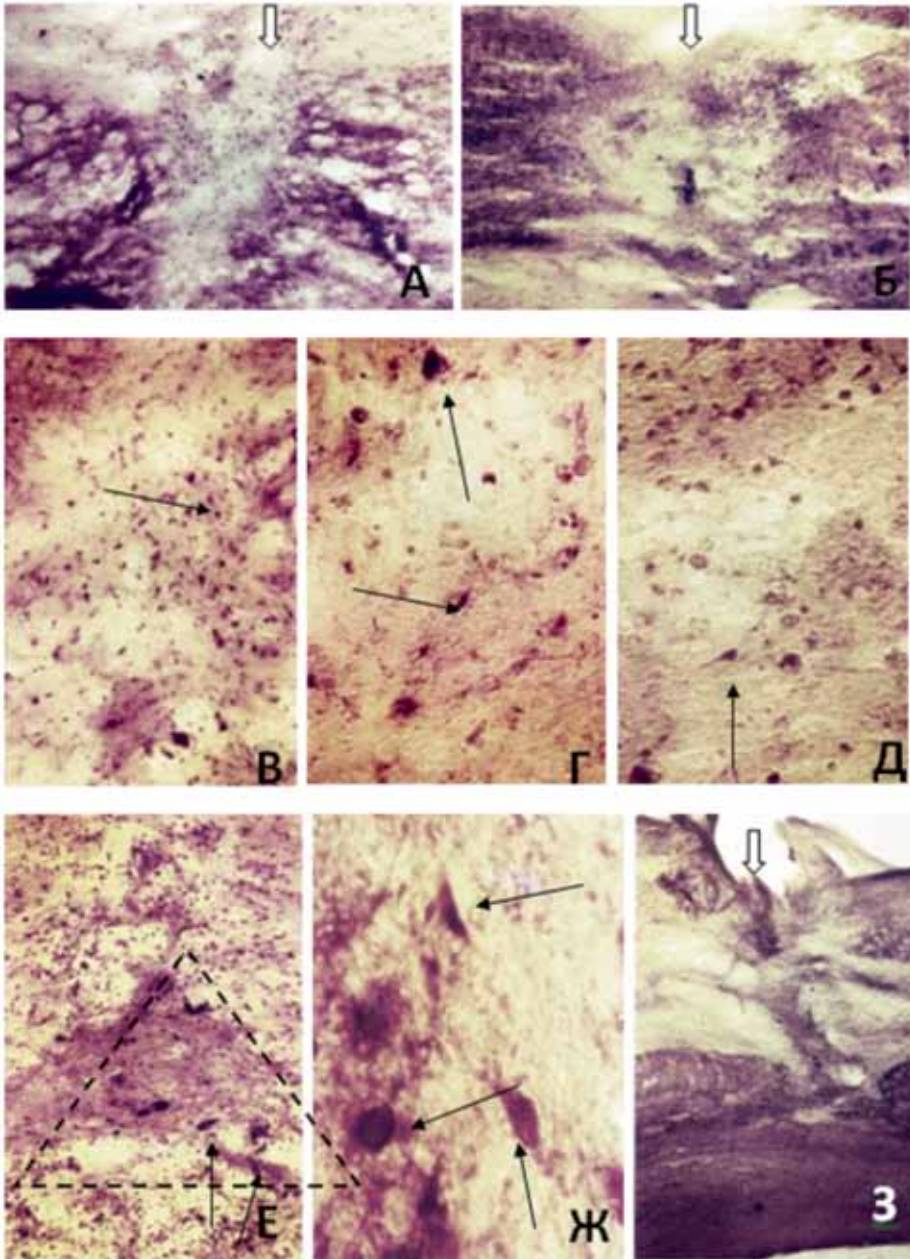


Рис. 3. Горизонтальные срезы спинного мозга крыс после иссечения руброспинального тракта (белая стрелка) с последующей инъекцией БМ. На месте перерезки наблюдается реакция ядер глиальных клеток, среди которых обнаруживаются темные клетки (черные стрелки); А и Б – место перерезки, Е – треугольником охвачено разрастание белого вещества спинного мозга, среди волокон которого видны темные клетки с высокой ферментной активностью (черные стрелки). Увеличение: 25 (З); 63 (Б); 100 (А); 160 (В-Е); 400 (Ж).

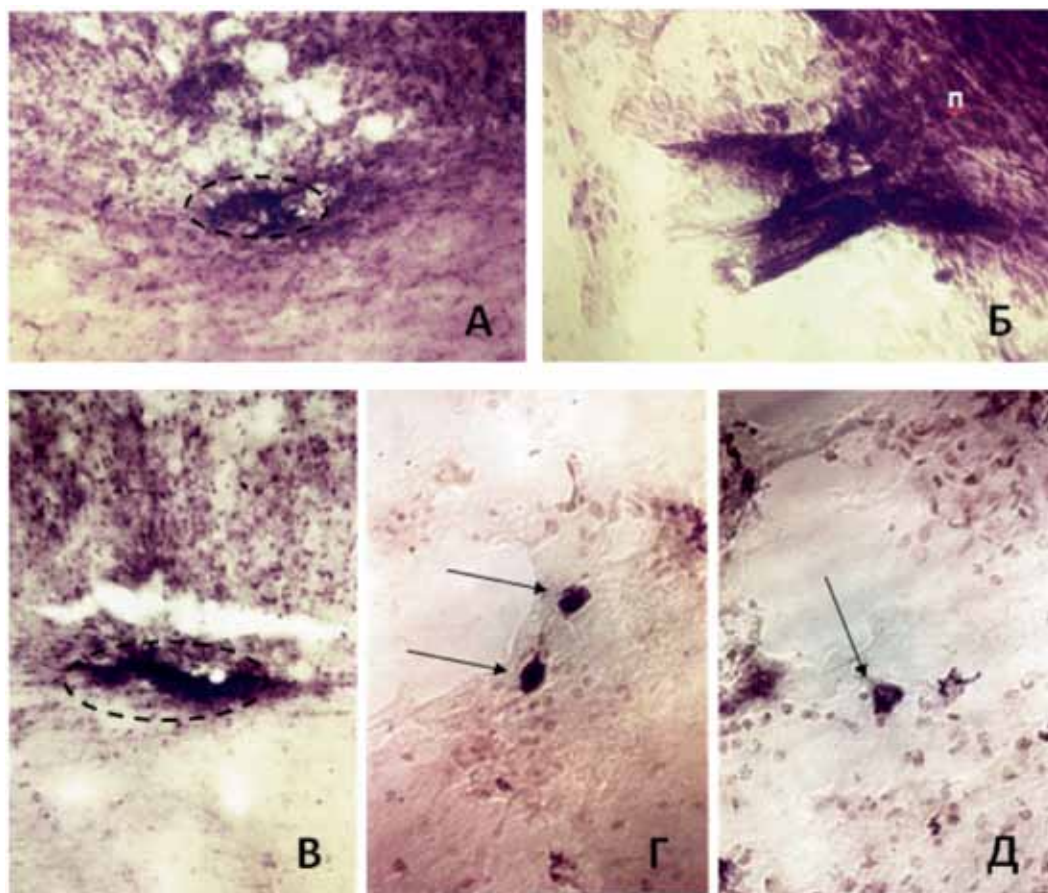


Рис. 4. Горизонтальные срезы спинного мозга крыс после иссечения руброспинального тракта с последующей инъекцией бактериального меланина. А, В – на месте перерезки наблюдается реакция ядер глиальных клеток и небольшие участки их сильного скопления в виде глиозного рубца (овал); Б – исходящий из проксимального отдела (п) пучок нервных волокон с высокой ферментной активностью; Г, Д – среди слабоокрашенных ядер глиальных клеток наблюдается реакция темных крупных клеток с высокой активностью КФ (черные стрелки). Увеличение: 100 (А); 160 (В); 400 (Б, Г, Д).

ем образования рубца и перерождения нервных клеток после травмы их аксонов, тем самым ускоряя восстановительные процессы в структурах ЦНС.

Нередко на уровне травмы в виде треугольника наблюдается разрастание слоя белого вещества с противоположной интактной стороны спинного мозга, в направлении к месту перерезки, среди волокон которых обнаруживаются темноокрашенные клетки (рис. 3Е). Под воздействием БМ размер травмы малень-

кий, без нагноения и уплотнения ткани. Анализ данных свидетельствует о сохранности нервных клеток проксимального отдела спинного мозга на границе места перерезки (рис. 3). Мотонейроны в этом отделе обладают высокой активностью КФ, ядра большинства клеток не окрашены, в цитоплазме обнаруживается зернистый осадок, отростки длинные. В целом, их можно охарактеризовать как нейроны, сходные с таковыми у интактных крыс.

Отметим, что у контрольных животных наблюдаются явления, напоминающие центральный хроматолиз: наличие клеток-теней, вплоть до полного их исчезновения.

В ряде случаев с проксимального отдела обнаруживается пучок нервных волокон, пересекающий место перерезки. В дистальном отделе ниже уровня перерезки на некотором протяжении наблюдаются очаги некроза, фрагментация и распад нервных волокон (рис. 4Б). Данное обстоятельство, по-видимому, можно считать выражением регенерации нервных волокон.

Особый интерес представляют довольно крупные, интенсивно окрашенные клетки, расположенные вокруг полостей на месте перерезки (рис. 4Г, Д). Судя по расположению в телах и отростках этих клеток осадка фосфата свинца в виде тигроида, они больше похожи на нервные клетки. Принадлежность их к астроцитам исключается, так как выбранная в данном эксперименте инкубационная смесь предназначена для избирательного выявления нервных клеток, в то время как у глиальных клеток окрашиваются только ядра. Однако, принимая во внимание реверсию эмбрионального фенотипа астроглиальных клеток, активацию миграционных процессов нейрональных стволовых клеток, микроглиоцитов или перемещение клеток-предшественников в зоны локальной дегенерации нервных клеток, можно также предположить, что эти клетки, по-видимому, относятся к типу радиальной глии [2]. Обнаруженные крупные, интенсивно окрашенные клетки можно рассматривать с точки зрения нейрогенеза.

Таким образом, несмотря на то, что при данных послеоперационных сроках терапевтический эффект при примене-

нии БМ не полностью обеспечивал сращивание обоих концов травмированного участка, можно констатировать благоприятный для дальнейшей регенерации факт – отсутствие прогрессирующей пролиферации ядер глиальных клеток, которое наблюдается у контрольных животных. Отмечается также значительная разница в степени инфильтрации раны глиальными клетками, а именно – в окружающей рану мозговой ткани наблюдается умеренная реакция ядер глиальных клеток, отсутствие грубого рубца и сохранность нервных клеток вокруг участка травмы.

Обсуждение результатов

Обычно после травмы ЦНС всегда наблюдается некоторое функциональное восстановление благодаря пластичности нервных структур. Конечно, пластичность в каждом отдельном случае отличается по своему временному течению и степени восстановления функций. В литературе отмечается возможность демаскирования молчащих синапсов [9] спустя несколько минут и в течение нескольких часов, что способствует избыточному высвобождению возбуждающих медиаторов, увеличению плотности постсинаптических рецепторов, изменению проводимости постсинаптической мембраны, следовательно, и уменьшению тормозного действия или его отмены [5, 8, 10, 17, 18].

Все эти процессы в нервной ткани ЦНС после травмы и введения БМ протекают намного быстрее. В длинной полимерной цепочке БМ имеются определенные активные составляющие (протеины с активной связью, свободные радикалы и т.д.), играющие важную роль в его протекторной функции. С помощью активных связей БМ способен

не только демаскировать латентные сигналы, но и тотально «оккупировать» постсинаптические рецепторы нейронов, вызывая мощные изменения на синаптическом уровне.

При компенсации двигательных и поведенческих нарушений после повреждения руброспинального тракта образованием, участвующим в ликвидации руброспинального дефицита, является кортикоспинальная система, что во многом определяется большим сходством структурных и функциональных особенностей этих двух нисходящих систем. Дефицит, вызванный одной из этих двух систем, является проходящим, а функциональное восстановление – результатом способности неповрежденной системы брать на себя контроль движения. Ведущим фактором в описанном феномене является взаимовлияние кортикоспинальной и кортико- руброспинальной систем, их свойство взаимозамещаемости, уникальное среди всех нисходящих двигательных систем [16]. Переключающее действие рубро-оливарной проекции может осуществляться в обоих направлениях, и в случае повреждения кортикоспинальной системы в компенсацию возникающих расстройств включается кортико-руброспинальная система [6].

Благодаря такому компенсаторному переключению функций восстановление ИУР происходит в обеих группах. Однако в группе, получавшей раствор меланина, на следующий день после операции восстановление ИУР и движений задней парализованной конечности происходит 4-5 раз быстрее, чем у контрольных

крыс. Балансирующее движение парализованной задней конечности у контрольных животных восстанавливается очень поздно, после 16 дней тестирования.

Заключение

В хроническом эксперименте на крысах с заранее выработанным инструментальным рефлексом балансирования на вращающейся перекладине исследовалось влияние одностороннего разрушения руброспинального тракта, а также действия раствора бактериального меланина, введенного на следующий день после операции. Показано, что у контрольных крыс после разрушения наблюдается гемипарез, который особенно отчетливо виден при балансировании оперированных животных на вращающейся горизонтальной перекладине. У второй группы крыс после внутримышечного введения бактериального меланина уже с третьего постоперационного дня наблюдается нормальное выполнение рефлекса на вращающейся перекладине, а балансирующее движение задней конечности полностью восстанавливается после пяти экспериментов. Итак, восстановление инструментального рефлекса балансирования после разрушения руброспинального тракта у крыс происходит полностью и за очень короткий срок. Это дает основание полагать, что введенная крысам концентрация бактериального меланина имеет выраженное нейропротекторное действие, благодаря чему у них достигается быстрое и полное, по сравнению с контрольными животными, восстановление нарушенных движений.

Список литературы

1. **Геворкян О.В., Меликсетян И.Б., Петросян Т.Р., Аветисян С.В., Овсепян А.С., Агаджанян А.Е., Манвелян Л.Р.** Восстановление инструментальных условных рефлексов у крыс после разрушения латерального ядра мозжечка и при воздействии бактериального меланина // материалы Международной конференции «Структурно-функциональные, нейрохимические и иммунохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга». - М. 2007. С. 178-181.
2. **Коржевский Д.Э.** Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейростологических исследованиях // Морфология. СПб.: Эскулап. 2006. Том 129. N 1. С. 85-86.
3. **Манвелян Л.Р., Геворкян О.В., Петросян Т.Р.** Восстановление инструментальных условных рефлексов у крыс после пирамидотомии и воздействия бактериального меланина // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2008. 44. (3). С. 268-273.
4. **Меликсетян И.Б.** Выявление активности Ca²⁺-зависимой кислой фосфатазы в клеточных структурах мозга крыс // Морфология. 2007. 131 (2): С. 77-80.
5. **Фанарджян В.В., Папоян Е.В., Геворкян О.В., Погосян В.И.** К механизму переключения нисходящих супраспинальных влияний // Доклады НАН Армении. 1999. 99 (1): С. 90-96.
6. **Фанарджян В.В., Папоян Е.В., Погосян В.И., Геворкян О.В.** Роль ВЛ ядра таламуса в переключении нисходящих влияний на двигательную активность крыс // Российский физиологический журнал. 2000. 86 (7): С. 753-761.
7. **Aghajanyan A.E., Hambarzumyan A.A., Hovsepyan A.S. Asaturyan R.A., Vardanyan A.A. and Saghyan A.S.** Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble Bacillus thuringiensis melanin Pigm // Cell. Research. 2005. V. 18. P. 130-135.
8. **Ding Yuemin, Abba J. Kastin, Weihong Pan.** Neural plasticity after spinal cord injury // Current Pharmaceutical Design. 2004. V. 10. P. 11381-11396.
9. **Donoghue J.P.** Limits of reorganization in cortical circuits // Cereb. Cortex. 1997. V. 7. P. 97-99.
10. **Donoghue J.P.** Plasticity of adult sensorimotor representations // Curr Opin Neurobiol. 1995. V. 5. P. 749-754.
11. **Donoghue J.P., Suner S., Sanes J.N.** Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. II. Rapid reorganization following motor nerve lesions // Exp. Brain Res. 1990. V. 79. P. 492-503.
12. **Fanardjian V.V., Papoyan E.V., Hovhannisyan E.A., Melik-Mussian A.B., Pogossian V.I., Gevorkyan O.V.** The role of some structures in the switching of the descending influences in operantly conditioned rats // Neuroscience. 2000. 98(2): 385-395.
13. **Fanardjian V.V., Papoyan E.V., Pogossian V.I., and Gevorkyan O.V.** Comparison of the effects of electrolytic and chemical destruction of the red nucleus on the compensatory capacity of rats with rubrospinal tract lesions // Neural Plasticity. 1999. 6(4). P. 123-131.
14. **H.J. ten Donkelaar.** Evolution of the red nucleus and rubrospinal tract // Behavioural Brain Research. 1988. V. 28. Issues 1-2, April-May. P. 9-20.
15. **Ji-Eun Kim, Betty P. Liu, James H. Park, and Stephan M. Strittmatter.**

- Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury // *Neuron*. 2004. 44: 439-451.
- 16. Kennedy P.R.** Corticospinal, rubrospinal and rubroolivary projections: a unifying hypothesis // *Trends Neurosci*. 1990. 13: 474-479.
- 17. Maier C.I. and Schwab M.E.** Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity // *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 2006. V. 361. P. 1611-1634.
- 18. Schwab M.E., Bartholdi D.** Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord // *Physiol. Rev*. 1996. V. 76. P. 319-370.

Bacterial melanin as an accelerator of motility recovery after damage of cortico-rubrospinal motor control system

T.R. Petrosyan, O.V. Gevorgyan

Unilateral destruction of rubrospinal tract, performed in 12 rats after initial training to instrumental conditioned reflex, caused hemiparesis of ipsilateral limbs. On the second day after the operation part of the operated rats were injected intramuscularly with the solution of bacterial melanin. Comparison of periods for recovery of the instrumental conditioned reflex and recovery of hind limb balancing movements in control rats and in rats injected with melanin showed that the post-traumatic recovery period for the later group is considerably shorter than for the control group. It was shown that the acceleration of motor recovery in the study group animals was caused by protective action of bacterial melanin and by facilitation of switching of descending influences from rubrospinal tract to corticospinal. Morphohistochemical study showed that bacterial melanin stimulates the sprouting of nervous fibers and enhances regeneration in CNS.

Key words: instrumental conditioned reflex, rubrospinal tract, bacterial melanin, posttraumatic recovery, morphohistochemical study.

Патологические изменения поджелудочной железы и печени рыб под действием аллоксана

Г.И. Пронина¹, А.О. Ревякин¹, Н.Ю. Корягина², А.А. Иванов³,
А.В. Золотова³, Г.Д. Капанадзе¹, О.И. Степанова¹, О.В. Баранова¹

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

² – Государственное научное учреждение ВНИИ ирригационного рыбоводства РАСХН

³ – РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, ar_info@mail.ru

Внутрибрюшинное введение аллоксана карпу и окуню в дозах от 200 и 300 мг/кг соответственно вызывает патологию поджелудочной железы и печени. У опытных рыб нарушается структура островков Лангерганса поджелудочной железы, происходит дегенерация клеток печени.

Ключевые слова: моделирование патологии, аллоксан, карп, окунь, поджелудочная железа, островки Лангерганса, гепатоциты.

Целью настоящей работы является моделирование патологии поджелудочной железы у рыб и коррекция патофизиологических изменений с помощью стволовых и прогениторных клеток костного мозга.

У некоторых рыб поджелудочная железа представлена в виде отдельных ходов, разбросанных 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. Кооперштейн [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.

Печень выполняет в организме разнообразные функции и благодаря этому чутко реагирует на любое внешнее воздействие изменением в обмене веществ. Анализируя состояние печени, можно судить об общем физиологическом состоянии организма, а также, в определенной степени, о характере патологических изменений в обмене веществ.

Печень рыб – паренхиматозный орган, представленный стромой и паренхимой. Строма органа состоит из соединительнотканного каркаса, а паренхима – из клеток различного происхождения (гепатоциты, эндотелиальные, жировые клетки, макрофаги и другие).

В норме главные клетки печени – гепатоциты занимают около 80% среза печени, имеют неправильную (полигональную) форму и относятся к растущему типу эпителия, характеризующегося низким коэффициентом истинной пролиферации и обновляемости [2].

Система образования и выведения желчи у рыб начинается желчным капилляром, не имеющим собственной стенки и образующимся мембранами соседних гепатоцитов. Желчные капилляры переходят в желчные внутрипеченочные протоки, которые выстланы однорядным эпителием. Протоковые клетки четко отличаются от паренхимных бедностью клеточных органоидов, отсутствием включений гликогена и секрета [1].

Материалы и методы

Объектами исследований являлись 10 сеголеток карпа (*Cyprinus caprio L.*) чешуйчатой и зеркальной групп. А также 3 самца окуня обыкновенного (*Perca fluviatilis*). Рыбы содержались в аквариальных условиях при температуре +14-16°C. Кормление осуществлялось личинками хирономид и комбикормом craft soft light (тонуший) для карпа в дозе 1-2% от массы тела. Экспериментальным карпам и окуням внутрибрюшинно вводили аллоксан в дозах 200 и 300 мг/кг соответственно.

Результаты и их обсуждение

На всем протяжении эксперимента (53 дня) гибели исследуемых сеголеток карпа не наблюдалось. Исключение составила одна особь чешуйчатого карпа: гибель наступила на третий день после введения аллоксана в дозе 200 мг/кг. Гистологические исследования показали разрушение структуры островков Лангерганса (рис. 1).

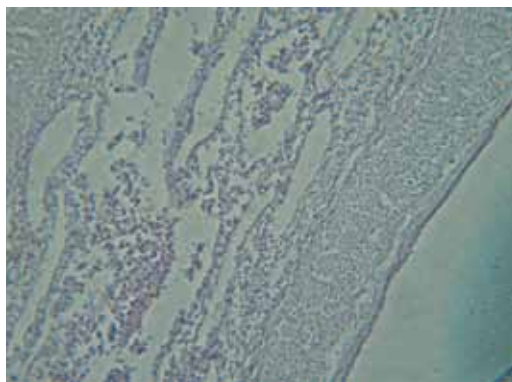
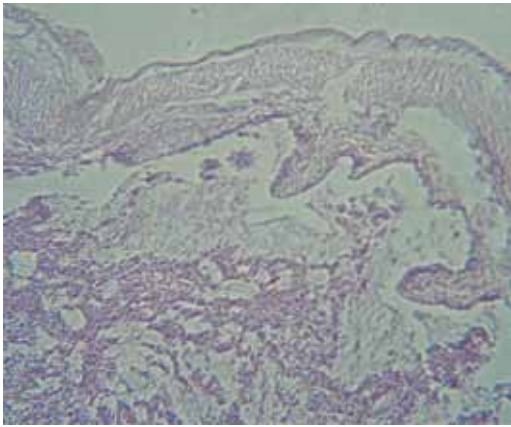


Рис. 1. Поджелудочная железа карпа под действием аллоксана на третьи сутки. Атрофия островков Лангерганса. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х 400.

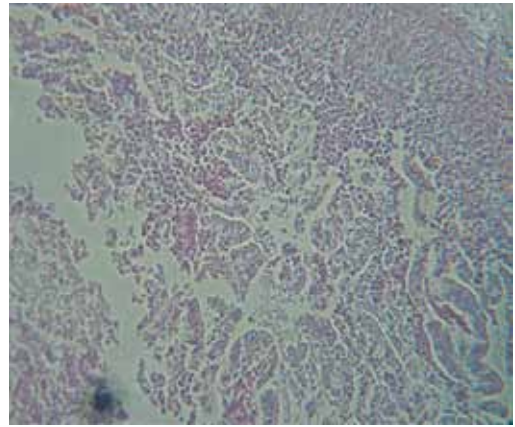
Все три взрослых самца окуня, участвующие в эксперименте, погибли на третий день после введения аллоксана в дозе 300 мг/кг. Гистологическая картина поджелудочной железы окуня показана на рис. 2.

При воздействии аллоксана были обнаружены патологические изменения в гистоструктуре печени как у окуня, так и у карпа, причем в большей степени у последнего. На препаратах печени карпа полностью нарушена архитектоника органа. Жировые капли замещают собой клетки печеночной паренхимы. Пустоты на месте экстрагированного жира во всех направлениях пронизывают ткань, создавая в ней многочисленные разрывы. Количество ядер гепатоцитов существенно меньше по сравнению с нормой (рис. 3).

Гепатоциты печени карпа и окуня в большей степени представлены одноядерными неправильной формы клетками с центрально расположенным сферическим ядром. Редко встречаются многоядерные клетки. В результате воздействия аллоксана наблюдается интенсивный процесс образования жировых включений в цитоплазме гепатоцитов и пикноз ядер. На срезах отчетливо видны



А



Б

Рис. 2. Поджелудочная железа окуня под действием аллоксана на третьи сутки. Атрофия островков Лангерганса. Окраска гематоксилин-эозином. А – ув. x 200; Б – ув. x 400.

синусоидные капилляры, выстланные эндотелиальными клетками. Между эндотелиальными клетками печени расположено пространство Диссе, просвет которого заполнен микроворсинками, образованными плазматическими мембранами гепатоцитов.

На препаратах синусоиды плотно заполнены различными клетками крови. Часто клетки крови выселяются в паренхиму печени, что может говорить о нарушении работы органа. Многие клетки печени окуня имеют неровные, ажурные края и бледно окрашенные ядра (рис. 4). На препаратах встречаются

ся круглые гепатоциты со смещенным к периферии ядром.

Средние диаметры гепатоцитов окуня имеют большую величину по сравнению с таковыми карпа и составляют 11,1 и 7,3 мкм соответственно ($p \leq 0,05$).

Выводы

Таким образом, введение аллоксана вызывает патологические изменения поджелудочной железы и печени рыб. В поджелудочной железе исследуемых гидробионтов наблюдается нарушение структуры островков Лангерганса. Ткани печени карпа и окуня характеризуют-

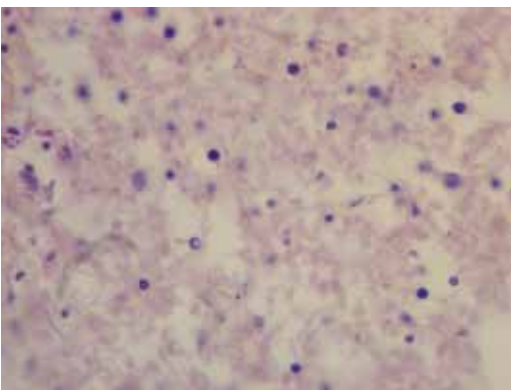


Рис. 3. Гистологическое строение печени карпа при воздействии аллоксана. Ув. x 600.

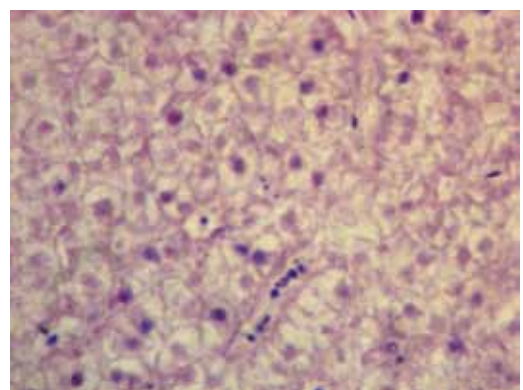


Рис. 4. Гистологическое строение печени окуня при воздействии аллоксана. Ув. x 600.

ся накоплением жировых включений в гепатоцитах, пикнозом их ядер, деструкцией самих гепатоцитов, выселением массы фагоцитов в паренхиму органа, интенсивной инфильтрацией форменными элементами крови и нарушением архитектоники органа. В печени карпа встречаются участки, обнаруживающие практически полную дегенерацию большей части клеток.

Список литературы

1. *Григорьев Н.И.* Строение и регенерация печени после её местного повреждения. – Л.: Медицина. 1975. 191 с.
2. *Салмова Н.А., Журавлева Н.Г.* Морфологическое строение печени и поджелудочной железы молоди трески (*Gadus morthua* L.) в условиях искусственного выращивания // Вестник МГТУ. 2012. Т 15. № 3. С. 551-558.
3. *Bormann I.* In Bolk: Hand der vergleichenden Anatomie der Wirbeltier 3. 1937.
4. *Laguesse E.* Structure du pancreas intrahépatique chez les poissons // C. R. Acad. 1891. № 112. 440 p.
5. *Lazarow A., Cooperstein J.* Studies on the isolated islet tissue of fish // Biol. Bull. Vol. 100. 1951. N 3. P. 191-198.

Pathological changes of the pancreas and liver of fishes under the influence of alloxan

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

The peritoneum injection through a carp and a perch alloxan in doses from 200 and 300 mg/kg respectively causes pancreas and liver pathology. At skilled fishes the structure of Langerhans islets of a pancreas is broken, there is a degeneration of cells of a liver.

Key words: pathology modeling, alloxan, carp, perch, pancreas, islets of Langerhans, hepatocytes.

Приживаемость клеток костного мозга мышей у рыб и речных раков

А.О. Ревякин¹, Г.И. Пронина¹, Н.Ю. Корягина², Г.Д. Капанадзе¹,
О.И. Степанова¹, О.В. Баранова¹, Н.В. Касинская¹

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

² – Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства РАСХН

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, ar_info@mail.ru

Эксперимент показал приживаемость стволовых клеток мышей-доноров в поджелудочной железе карпа и гепатопанкреасе речных раков. Это было подтверждено гистологическими методами и обнаружением гена зеленого белка с помощью полимеразной цепной реакции.

Ключевые слова: стволовые клетки, гидробионты, поджелудочная железа, гепатопанкреас, ген зеленого белка, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Введение

Стволовые клетки – это клетки, сохраняющие потенциал к развитию в разных направлениях, способные к делению и дифференцировке. В большинстве своем, они находятся в костном мозге (КМ), но есть и другие источники, такие как периферическая или пуповинная кровь [2].

Родоначальницей всех клеток крови является СКК (стволовая кроветворная клетка), которая может развиваться в различные виды зрелых клеток. Она способна к самоподдержанию, т.е. производству себе подобных клеток. Основными свойствами популяции СКК являются:

1) полипотентность (возможность дифференцироваться по всем росткам кроветворения);

2) способность к самоподдержанию (дифференцировка одной СКК сопровождается делением другой СКК, в связи с чем появляется новая, «дочерняя» СКК, и суммарное количество клеток не

уменьшается).

Направление дифференцировки СКК определяется кроветворным микроокружением.

К ближайшим потомкам СКК относятся миелоидная и лимфоидная СКК, которые могут дифференцироваться, соответственно, в клетки миелоидного и лимфоидного ряда.

Пересадка стволовых клеток в настоящее время считается лучшим решением при лечении многочисленных злокачественных и незлокачественных заболеваний.

Стволовые клетки донора вводятся в кровеносную систему пациента путем инфузии. Эти клетки могут создать новую систему крови в теле пациента и иммунные лимфоциты. В процессе эмбриогенеза эмбриональные стволовые клетки способны сохранять плюрипотентность и свойство самообновления очень недолго, после чего переходят в мульти- и по-

липотентные клетки коммитированных зародышевых линий [3].

Целью нашей работы являлось изучение приживаемости стволовых клеток мышей-доноров у гидробионтов-реципиентов.

Материалы и методы

Объектами настоящего исследования являлись сеголетки карпа (*Cyprinus carpio L.*) зеркальной и чешуйчатой групп и длиннопалые речные раки (*Pontastacus leptodactylus*).

Патология поджелудочной железы рыб была вызвана внутрибрюшинным введением аллоксана в дозах 100, 200 и 300 мг/кг. Гепатопанкреас речных раков разрушался введением аллоксана в дозах 50 и 100 мг/кг, а также кормлением комбикормом с содержанием жира свыше 17% (комбикорм для форели и сига «craft soft light»). При кормлении личинками хируномид патологии гепатопанкреаса не происходило.

Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (время гибели животных – 30-40 мин). Исследовали жизнеспособность гемопоэтической и стромальной фракций клеток костного мозга (ККМ) по окраске трипановым синим.

Культура ККМ вводилась рыбам внутривенно, речным ракам – в вентральный синус. Доза введения составила 8-10 млн культивированных ККМ. Вскрытие опытных объектов производилось на 7-й, 14-й и 21-й день после введения ККМ.

Забор ККМ, содержащих ген зеленого белка (GFP), проводили у мышей-доноров под эфирным наркозом. Стерильно иссекали кости предплечья, плеча, голени и бедра вместе с сустава-

ми и отделяли их от мышц. Далее кости обрабатывали в 70% этаноле, стерильно ножницами отсекали суставы и с помощью шприца (1 и 2 мл), вымывали ККМ раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) из костномозгового канала.

Полученную смешанную суспензию клеток центрифугировали при 1500 об./мин вместе с лизирующим раствором (114 mM NH_4Cl ; 7,5 mM KHCO_3 ; 100 мкМ EDTA) из расчета 1:4 в течение 5 мин при комнатной температуре (22°C).

Затем надосадочную фазу удаляли путем отсасывания. Отмытую от эритроцитов и полученную смесь клеток ресуспендировали в питательной ростовой среде DMEM (ПанЭко), содержащей 25мМ HEPES, 0,58 г/л глутамина, 100 мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA), 5 мкг/л инсулина. Клетки культивировали во флаконах при +37°C в CO_2 -инкубаторе, атмосфере с 5% CO_2 и 95% влажности в течение 3-х суток [1].

ПЦР, со своей высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет гарантированно быстро и надежно получить результат.

Эксперимент проводился в три этапа:

1. Выделение ДНК из пробы печени мышей при помощи набора Diatom DNA Prep 100 (ООО «Компания Биокор», Россия), по инструкции фирмы-производителя.

2. Амплификация геномной ДНК (в термоциклере «Терцик», компания «ДНК-Технология», Россия).

3. Идентификация ПЦР продуктов методом горизонтального электрофореза. Гели сканировали в ультрафиолетовом свете при помощи трансиллюминатора GellChemi Doc («Bio-Rad» США). Наличие в геле полоски ДНК соответствующей

щего размера свидетельствует о наличии в образце искомого гена.

Результаты и их обсуждение

Через 3 суток культура ККМ мышей содержала до 50% свободно плавающих в суспензии с питательной средой округлых неприкрепившихся к пластику гемопоэтических клеток на разных сроках дифференцировки (гемопоэтические клетки, лимфоциты, моноциты) и до 50% прикрепившихся распластанных фибробластоподобных клеток – мультипотентных мезенхимальных стромальных ККМ. Полученная смешанная культура из гемопоэтических и стромальных ККМ от мышей-доноров была готова для трансплантации (рис. 1).

Гибели экспериментальных гидробионтов не отмечалось. Эксперимент показал успешную трансплантацию стволовых клеток мышей-доноров у всех реципиентов.

При микроскопии внутренних органов наблюдалось зеленое свечение ККМ с геном GFP (рис. 2).

Результаты исследования подтверждены проведением ПЦР, в результате

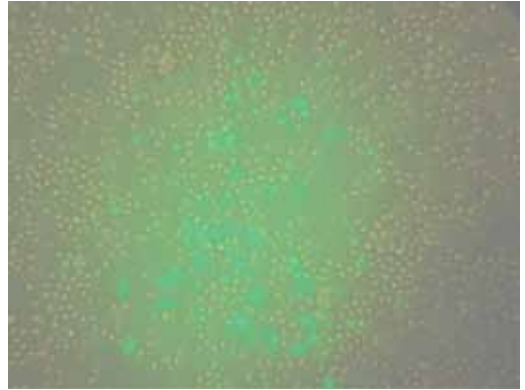


Рис. 1. Культура клеток на третьей сутки культивирования.

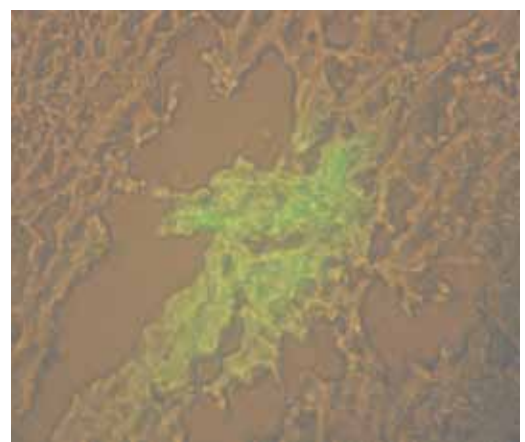
которого были получены электрофоретические спектры продуктов амплификации и во всех опытных образцах идентифицирован ген GFP (рис. 3).

Выводы

Таким образом, впервые показано, что клетки костного мозга мышей успешно приживаются в организме рыб и речных раков.



А



Б

Рис. 2. Клетки мышьи-донора: А – в поджелудочной железе карпа на 21-е сутки; Б – в гепатопанкреасе длиннопалого речного рака на 14-е сутки после введения.

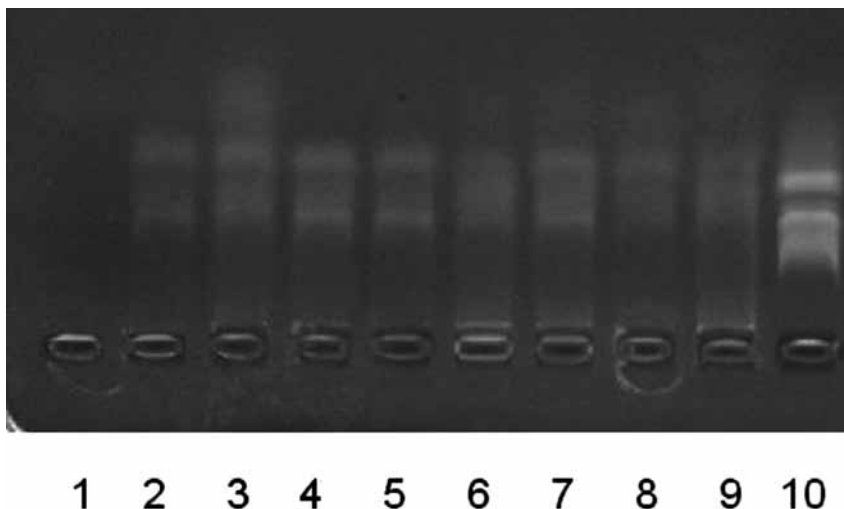


Рис. 3. Результаты ПЦР в образцах ткани от экспериментальных гидробионтов.
1 – контроль (вода); 2, 3, 4, 5 – карпы; 6, 7, 8, 9, 10 – речные раки.

Список литературы

1. Касинская Н.В., Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Деньгина С.Е. Ген зеленого белка как маркер при трансплантации стволовых и прогениторных клеток костного мозга // Биомедицина. 2011. № 2. С. 30-34.
2. Шахов В.П., Попов С.В. Стволовые клетки и кардиомиогенез в норме и патологии. - Томск: STT. 2004. 170 с.
3. Bianco P., Cossu G. Uno nesstmo e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors // Exp. Cell. Res. 1999. № 251. P. 257-263.

Survival of mice marrow cells at fishes and river crayfish

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

The experiment showed survival of stem cells donor mice in the carp pancreas and river crayfish hepatopancreas. It was confirmed with histologic methods and detection of green fluorescent protein gene by polymerase chain reaction.

Key words: stem cells, hydrobionts, pancreas, hepatopancreas, green fluorescent protein gene, polymerase chain reaction (PCR).

Морфофункциональные особенности клеток крови в условиях опухолевого роста

Е.А. Сладкова, М.Ю. Скоркина, Н.А. Забияков

НИУ «Белгородский государственный университет», Белгород

Контактная информация: Сладкова Евгения Анатольевна, evgenija-sladkova00@rambler.ru

Методом атомно-силовой микроскопии выявлены изменения морфологических параметров и микро-рельефа клеток крови при моделировании экспериментальных эстрогензависимых опухолей яичников. Показано, что лейкоциты являются популяцией, отражающей развитие неопластического процесса. Трансформации белых клеток крови проявляются в распластывании на подложке, сглаживании микро-рельефа плазмалеммы и увеличении площади поверхности. Развитие опухолевого процесса сопровождается снижением жесткости лимфоцитов и ее повышением у эритроцитов во всех точках нанои-дентирования. Установленные особенности позволяют прогнозировать изменения иммунной активности лейкоцитов при неопластических процессах.

Ключевые слова: клетки крови, модуль упругости, АСМ, цитоархитектоника.

Введение

Экспериментальные результаты, накопленные в области физиологии канцерогенеза, указывают на то, что следствием опухолевой трансформации клеток является изменение их морфофункциональных свойств. В частности, описаны преобразования, проявляющиеся в изменении локомоторного поведения неопластических клеток, связанного с нарушениями в структуре актинового цитоскелета и системы микротрубочек [13], что является ключевым моментом в приобретении ими способности к метастазированию [9].

Несмотря на широкий спектр исследований, выполненных к настоящему моменту, неизученными остаются вопросы о влиянии опухолеродных тканей на морфофункциональные характеристики форменных элементов крови. Решение этой задачи стало возможным благодаря внедрению методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) в биологические исследования.

Приемы АСМ позволяют количественно оценить локальный модуль упругости [2], проследить изменения механических свойств и особенностей цитоархитектоники гемоцитов [4], непосредственно контактирующих с трансформированными клетками на стадии прогрессии опухоли и участвующих в формировании метастатических очагов в организме.

Целью настоящего исследования являлось изучение морфофункциональных особенностей клеток крови при моделировании экспериментальных опухолей яичников.

Материалы и методы

Исследования выполнены на базе кафедре анатомии и физиологии живых организмов Белгородского государственного университета. Объект исследования – периферическая кровь беспородных лабораторных трехмесячных самок серой крысы *Rattus norvegicus*. Работа проведена с соблюдением требований

Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными [11]. Крысы содержали в виварии при температуре 18-20°C и относительной влажности воздуха 30-70%. В комнатах содержания соблюдали 12-часовой цикл освещения «день-ночь» и не менее чем 11-кратную смену объема воздуха в час, концентрация CO₂ – не более 0,15 объемных %, аммиака – не более 0,001 мг/л. Животные получали стандартный пищевой рацион ПК-120-1 и воду, соответствующую ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая». Масса животных на начало эксперимента составляла 100-120 г.

Экспериментальные опухоли яичников моделировали путем введения 17β-эстрадиола (эстрон), 1 мл масляного раствора которого содержал в пересчете на 100% сухого вещества 1 мг эстра-1,3,5-(10)-триен-17-он [7]. Гормон вводили животным опытной группы (15 особей) внутривентриально, в концентрации 60 мкг в день, в течение 14 дней. Параллельно контрольной группе животных (15 особей) вводили 0,6 мл 0,9% NaCl.

Подготовку образцов клеток крови для исследования осуществляли по следующей схеме. Забор крови проводили путем декапитации предварительно наркотизированных эфиром животных. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 Ед/мл. Кровь центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин, собирали нижнюю часть плазмы, богатую лейкоцитами, и лейкоцитарное кольцо. Примесь эритроцитов разрушали 0,83% раствором хлорида аммония. Лейкоциты дважды отмывали изотоническим буферным раствором (раствор Дульбекко, рН=7,4). Эритроциты также отмывали и ресуспендировали в изотоническом буферном растворе (рН=7,4). Методом АСМ исследовали по 15 клеток в каждой из серий пробоподготовки. Сканирование натив-

ных клеток крови проводили на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71), согласно разработанному на кафедре «Способу исследования нативных клеток крови» [8].

Изучение морфологических параметров выполняли в режиме полуконтактного сканирования [10] с частотой развертки 0,6-0,8 Hz, используя кантилевер серии NSG03, с жесткостью 1,1 Н/м и радиусом закругления 10 нм. Оценку структурных неоднородностей поверхности проводили по профилям бокового сечения клеток. Исследование упругих свойств гемоцитов осуществляли методом силовой спектроскопии. Расчет локального модуля Юнга в каждой точке нанoidентирования производили на основе модели Герца в модификации Снедона [15]. При работе с клетками предполагалось, что клетка есть упругая изотропная среда с коэффициентом Пуассона $\nu=0,5$, а игла АСМ – твердый конус. Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследований

Результаты исследования геометрических параметров и микрорельефа клеток крови в норме и при моделировании экспериментальных опухолей. В результате проведенных экспериментов установлено, что диаметр и объем лимфоцитов животных опытной группы увеличился на 10,5% и 30,4% ($p<0,05$) соответственно по сравнению с контролем (табл. 1), при этом высота клеток снизилась на 12,8% ($p<0,05$). Различий в микрорельефе поверхностей лимфоцитов опытной и контрольной групп не выявлено.

У нейтрофилов опытных животных установлено уменьшение объема на 36%

Морфометрические параметры форменных элементов крови крыс, полученные методом АСМ

Группы	D, мкм	H, мкм	V, мкм ³	S, мкм ²
Лимфоциты				
Контроль	6,89±0,08	0,86±0,04	27,20±1,55	54,94±3,07
Опыт	7,70±0,24*	0,75±0,01*	39,07±2,21*	53,81±2,17
Нейтрофилы				
Контроль	10,15±0,25	0,69±0,05	61,34±9,32	99,37±9,4
Опыт	9,49±0,22	0,60±0,07	39,21±4,81*	107,88 ± 7,13
Эритроциты				
Контроль	5,67±0,05	0,58±0,01	20,96±0,70	39,54±1,53
Опыт	5,67±0,08	0,58±0,01	20,97±0,65	43,48±1,32

Примечание: D – диаметр; H – высота; V – объем; S – площадь поверхности.

* – достоверность различий опытной группы по сравнению с данными контрольной группы при $p \leq 0,05$.

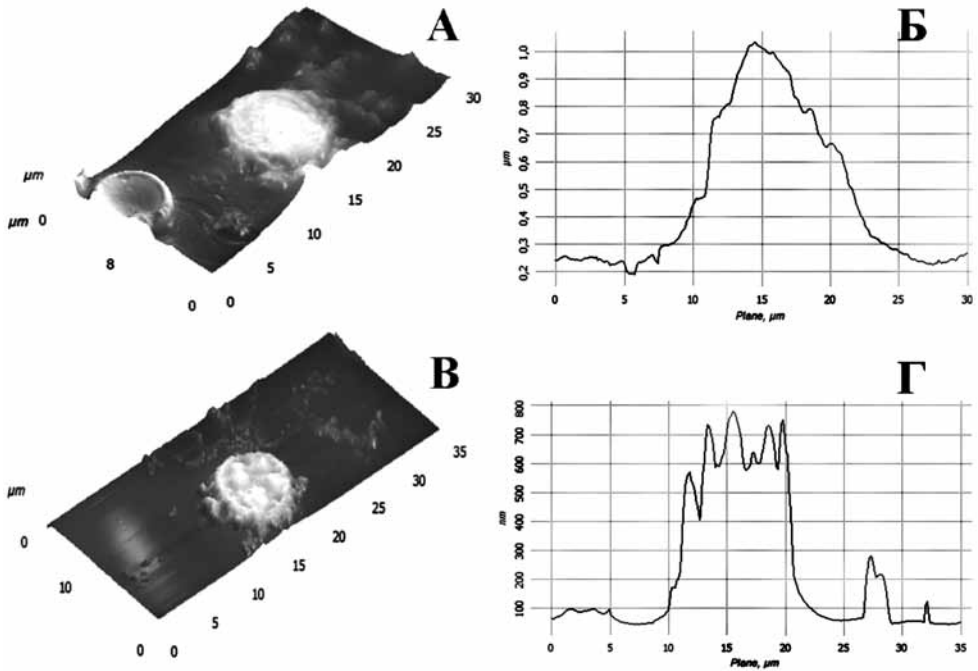


Рис. 1. АСМ-изображение и профиль нейтрофилов крыс.

А – 3D-изображение нейтрофила опытной группы; Б – кривая профиля нейтрофила опытной группы; В – 3D-изображение нейтрофила контрольной группы; Г – кривая профиля нейтрофила контрольной группы.

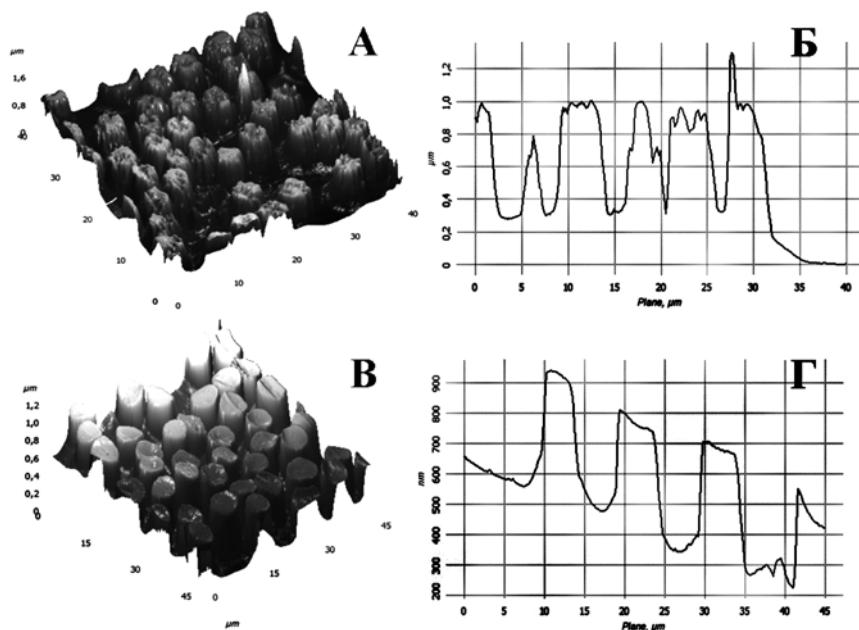


Рис. 2. АСМ-изображение и профиль эритроцитов крыс.

А – 3D-изображение эритроцита опытной группы; Б – кривая профиля эритроцита опытной группы; В – 3D-изображение эритроцита контрольной группы; Г – кривая профиля эритроцита контрольной группы.

($p < 0,05$; см. табл. 1) и сглаживание рельефа поверхности (рис. 1А, Б) по сравнению с контролем. В нейтрофилах контрольной группы животных морфологических изменений не обнаружено (рис. 1В, Г).

Установлено, что поверхность эритроцитов животных опытной группы была шероховатой, с выступами в области пэнора. Наряду с дискоцитами наблюдали клетки эхиноцитарной формы (рис. 2А, Б). Эритроциты контрольной группы животных были обычной двояковогнутой формы, особенностей в рельефе клеток не выявлено (рис. 2В, Г).

Результаты измерения модуля упругости клеток крови в норме и при моделировании экспериментальных опухолей. По результатам силовой спектроскопии установлено уменьшение жесткости лимфоцитов опытных животных во всех точках нанoidентирования по сравнению с контролем (табл. 2). Наибольшие сни-

жения модуля упругости клеток зафиксированы по краю цитоплазмы (точка 3) и в области ядра (точка 13) на 30% и 35% соответственно ($p < 0,05$). В зоне перинуклеарного пространства (точки 8, 9, 17, 18) модуль Юнга уменьшился, в среднем, на 33,7% ($p < 0,05$).

У нейтрофилов крыс опытной группы увеличение модуля упругости наблюдали по периферии клетки (точка 3) на 52% ($p < 0,05$). В области сегментированного ядра (точки 12, 18) выявлено снижение жесткости, в среднем, на 51% ($p < 0,05$; см. табл. 2).

Обсуждение результатов

В группе животных с экспериментально индуцированными опухолями выявлено увеличение морфологических параметров (диаметра и объема) лимфоцитов, однако размеры нейтрофилов и их высота уменьшились, что, вероятно,

Упругость клеток крови крыс контрольной и опытной групп по точкам наноидентирования, Па

Точки	Контроль			Опыт		
	Лимфоциты	ПМЯЛ	Эритроциты	Лимфоциты	ПМЯЛ	Эритроциты
3	14,66±1,08	12,77±2,27	15,17±0,99	10,27±1,55*	26,48± 2,14*	23,25±3,34*
4	12,23±0,82		12,56±0,75	9,05±2,44	28,61±1,26*	18,21±0,61*
7	12,66±0,65	13,31± 2,09	13,79±0,66	10,16±1,45	25,27± 3,91	17,65±4,26
8	14,69±0,72	17,14± 2,06	14,76±0,79	9,74±1,00*	19,23± 3,95	21,93±2,09*
9	12,43±1,10	15,57± 2,28	13,53±0,64	9,09±0,67*	8,11± 0,94*	19,54±2,09*
10			9,16±1,35	8,08±0,80*	14,16± 1,40	15,31±3,65
12	13,87±1,49	16,50± 1,52	13,74±0,73	9,26±0,73*	15,76± 4,10	14,27±3,01
13	14,27±0,99	14,97± 1,39	12,93±0,74	12,45±1,56	5,06± 1,89*	20,58±2,29*
14	11,81±0,80	17,75± 1,75	13,16±0,82	9,00±0,81	23,93± 3,24*	23,94±2,94*
15	11,22±3,24		8,79±0,41	7,40±0,27*	26,48± 2,14*	8,35±1,92
17	12,86±0,64		12,10±0,73	8,95±1,16*	28,61± 1,26*	21,41±2,89*
18	13,37±1,36	12,38± 2,31	13,59±0,96	11,37±2,07	25,27± 3,91	22,79±3,27*
19	12,58±0,89	12,69± 1,59	13,47±0,94	10,27±1,55*	19,23± 3,95	19,84±3,07
23			13,05±1,45	9,05±2,44	8,11± 0,94*	14,48±1,49

Примечание: * – достоверность различий опытной группы по сравнению с данными контрольной группы при $p \leq 0,05$.

свидетельствует об изменении функциональных свойств лейкоцитов [5]. Сглаживание микрорельефа нейтрофилов, протекающее на фоне снижения модуля Юнга в эксцентрично расположенных участках ядра и увеличения жесткости по краю цитоплазмы клеток в условиях опухолевого роста, указывает на их цитотоксическую активность, секреторную дегрануляцию, респираторный взрыв [5] и, как следствие, повышение их адгезии к сосудистой стенке [12]. В результате повышенной адгезивной активности клеток может спровоцировать длительные остановки кровотока, приводящие к нарушению микроциркуляции и ухудшению оксигенации тканей [14], поэтому важной компенсаторно-приспособительной реакцией, протекающей на клеточном

уровне, является снижение жесткости как нейтрофилов, так и лимфоцитов, которые будут легче деформироваться.

Не исключено, что снижение жесткости в лимфоцитах по периферии клетки, в области ядра и околоядерного пространства связано с выполнением ими иммунных функций, за счет интенсификации таких мембранных процессов как взаимодействие рецепторов со вторичными мессенджерами и лигандами [1].

Появление выступов в области пелора эритроцитов на фоне увеличения жесткости клеток, возможно, способствует их агрегации в «монетные столбики» [6] и ухудшению упруго-эластических свойств [15], что негативно отразится на процессах трансмембранного обмена газов в капиллярном русле.

Выводы

Таким образом, с помощью метода атомно-силовой микроскопии оценены морфофункциональные параметры клеток крови при экспериментальных опухолях яичников. Для лимфоцитов характерно увеличение площади поверхности и диаметра, сопровождаемое снижением их высоты и жесткости мембраны. Морфологические преобразования нейтрофилов проявляются в увеличении площади поверхности и уменьшении диаметра, высоты и объема. Модуль упругости нейтрофилов снижается в участках сегментированного ядра и возрастает в области околядерного пространства. В популяции эритроцитов обнаружены выступы в области пэнора и утрата центрального просветления. В условиях неопластического процесса модуль Юнга красных клеток крови возрастает во всех точках нанoidентирования. Выявленная инверсия морфологических параметров и механических свойств эритроцитарной популяции указывает на то, что опухолевый рост провоцирует появление «жестких» клеток, затрудняющих кровоток по сосудистому руслу.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг.» (Проект НК-40Р П396).

Список литературы

1. **Горошинская И.А., Голотина Л.Ю., Горло Е.И. и др.** Изменение вязкости мембран лимфоцитов и эритроцитов крови у онкологических больных // Вопросы медицинской химии. 2000. № 1. С. 50-52.
2. **Ибрагимов М.И.** Разработка методики предварительного мониторинга онкоурологических заболеваний // III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика». 2010. Т. 4. С. 65-64.
3. **Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Славина Е.Г.** Регуляторные Т-клетки и их роль в противоопухолевом иммунном ответе // Вопросы онкологии. 2009. Т. 55. № 3. С. 269-275.
4. **Лоншакова В.М.** Изменение физико-химических показателей мембран эритроцитов и лимфоцитов при светло-клеточном раке почки // III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика». 2010. Т. 4. С. 146-151.
5. **Мальцева В.Н., Авхачева Н.В., Санталов Б.Ф., Сафронова В.Г.** Наблюдение в динамике модификации функциональной активности периферических нейтрофилов и ее регуляции при росте опухоли in vivo // Цитология. 2006. Т. 48. № 12. С. 1000-1009.
6. **Матюхина Т.Г., Пантелей С.О., Кузнецова Т.А.** Атомно-силовая микроскопия эритроцитарных мембран // Доклады Бел. СЗМ. 2004. С. 97-101.
7. Патент на изобретение G01N33/74 RU 2223503 (13) C2 Способ определения ДНК-повреждающей способности эстрогенов / Берштейн Л.М., Порошина Т.Е., Цырлина Е.В. – № 2001101708/15, заявл. 17.01.2001 // опубл. 27.11.2002.
8. Патент на изобретение G01N33/49 RU 2398234 (13) C1 Способ исследования нативных клеток / Федорова М.З., Скоркина М.Ю., Чернявских С.Д., Сладкова Е.А., Забиняков Н.А. – № 2009125268, заявл. 01.07.2009 // опубл. 27.08.2010.
9. **Ровенский Ю.А.** Морфогенетические реакции клеток и их нарушения

- при опухолевой трансформации // Канцерогенез. – М.: Медицина. 2004. С. 376-414.
- 10. Федорова М.З., Павлов Н.А., Зубарева Е.В. и др.** Использование атомно-силовой микроскопии для оценки морфометрических показателей клеток крови // Биофизика. 2008. Т. 53. № 6. С. 555-559.
- 11.** Хельсинкская декларация этических принципов. 2008.
- 12. Benoit M.** Measuring cell adhesion forces with the atomic force microscope at the molecular level // Cell. Tissues organs. 2002. V. 172. P. 174-189.
- 13. Gupta G.P., Massague J.** Cancer metastasis: building a framework // Cell. 2006. V. 127. P. 679-695.
- 14. Ritter L.S.** Leukocyte accumulation and hemodynamic changes after stroke // Stroke. 2000. V. 31. P. 1153-1161.
- 15. Wojcikiewicz E., Zhang X., Moy V.** Force and compliance measurements on living cells using atomic force microscopy // Biol. Proced. Online. 2004. V. 6(1). P. 1-9.

Morphological and functional peculiarities of blood cells at tumor growth condition

E.A. Sladkova, M.Yu. Skorkina, N.A. Zabinyakov

By atomic force microscopy morphological changes of parameters and micro-relief of the blood cells in the modeling of experimental estrogen-dependent tumors of the ovary are revealed. It is shown that white blood cells are a population that reflects the development of a neoplastic process. Leukocytes transformation showed the spreading on a slide, cell surface smoothing, and increasing the size of the cell surface area. The rapidity of tumor growth accompanied the decrease of lymphocytes rigidity and its increase for erythrocytes along the cell surface. Installed features allow to predict changes in the immune activity of leukocytes in neoplastic processes.

Key words: blood cells, Young's modulus, atomic force microscopy, cytoarchitecture.

Особенности каталитических и кинетических свойств альдегиддегидрогеназы в жизненно важных органах при экспериментальной термической травме

А.Г. Соловьева

ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава России

Контактная информация: к.б.н. Соловьева Анна Геннадьевна, sannag5@mail.ru

Изучены каталитические и кинетические свойства альдегиддегидрогеназы (АлДГ) в различных органах при экспериментальной ожоговой травме. Крысам линии Wistar под эфирным наркозом наносили ожог кипятком (20%), экспозиция – 3 с. Животных выводили из эксперимента на 3-и, 7-е и 10-е сутки после травмы. Активность альдегиддегидрогеназы и концентрацию белка определяли в гомогенате тканей (печень, почки, сердце и легкие). Из первичных экспериментальных данных полной кинетической кривой зависимости продукта реакции от времени рассчитывали кинетические характеристики АлДГ (K_t , V_{max} , V_{max}/K_t). Установлено, что при термической травме происходит перераспределение общей активности альдегиддегидрогеназы между печенью, почками, сердцем и легкими по сравнению с контрольными животными: при ожоге наибольшая общая активность АлДГ наблюдается в почках, наименьшая – в легких (3-и, 7-е сутки после травмы). Выявлено уменьшение удельной активности альдегиддегидрогеназы в печени и легких (наиболее выраженное на 7-е сутки после термического повреждения), снижение коэффициента каталитической эффективности АлДГ и увеличение времени достижения $\frac{1}{2} V_{max}$ ферментативной реакции. Отмечено повышение удельной активности фермента в почках и сердце (максимальное – на 10-е сутки), обусловленное возрастанием коэффициента каталитической эффективности и сродством фермента к субстрату. Падение общей и удельной активности альдегиддегидрогеназы в печени на 3-и, 7-е и 10-е сутки после ожога свидетельствует о наибольшем повреждении данного органа при термической травме.

Ключевые слова: альдегиддегидрогеназа, экспериментальная термическая травма, органоспецифичность.

Введение

Проблема изучения каталитических свойств ферментов при термических поражениях не потеряла своей актуальности в современном техногенном мире. Ожоговая болезнь всегда сопровождается развитием интоксикации, обусловленной многочисленными неспецифическими токсическими метаболитами и биологически активными веществами [7, 8]. Окислительный стресс, возникающий при термическом поражении, приводит к накоплению высокотоксичных альдегидов,

которые образуют аддукты с белками, нуклеиновыми кислотами, вмешиваются в энергетический обмен, изменяют клеточные функции [10]. В повышенных концентрациях данные соединения вызывают ряд отрицательных эффектов: нарушают структуру и функции плазматических и внутриклеточных мембран, выступают в качестве ингибиторов активности многих ферментов сыворотки крови в результате прямого взаимодействия модифицируют белки тканей. Токсичные среднепочечные альдегиды (алканыли, алкенали

и 4-гидроксиалкенали) генерализуются в течение липидной пероксидации, которая усиливается при термической травме [11, 12]. Большая часть продуктов перекисного окисления липидов приходится на долю малонового диальдегида (МДА), весьма активно реагирующего с аминокетто-группами белков и нуклеиновых кислот, образуя внутри- и межмолекулярные сшивки. МДА, встраиваясь в клеточные мембраны, образует основания Шиффа, нарушающие физико-химические свойства последних, особенно их эластичность и проницаемость [7]. Известно, что основным ферментом, участвующим в утилизации альдегидов, является альдегиддегидрогеназа (АлДГ), представленная во всех тканях [4]. Данные об изменении кинетических и каталитических свойств АлДГ при ожоговой травме немногочисленны. В связи с этим, исследование каталитических и кинетических свойств альдегиддегидрогеназы как одного из основных маркеров биотрансформации в норме и при термической травме является актуальным.

Целью работы являлось изучение каталитических и кинетических свойств альдегиддегидрогеназы в различных органах крыс при экспериментальном ожоге.

Материалы и методы

В эксперименте использованы самцы белых крыс Wistar (Филиал «Столовая» НЦБМТ ФМБА России, Московская область), массой 180-250 г, содержащиеся на стандартном рационе вивария и имевшие свободный доступ к воде. Животные были разделены на две группы: контрольную (интактные крысы, $n=10$) и опытную (крысы с ожогом, $n=10$). Животным опытной группы под эфирным наркозом наносили ожог кипятком на депилированную поверхность спины (20%), экспозиция – 3 с. [1]. Крыс выводили из эксперимента на 3-и, 7-е и 10-е сутки после травмы путем декапитации под эфирным наркозом. Внутренние органы (печень, почки, сердце и легкие) забирали для биохимических исследований. Использовали 10% гомогенат тканей на основе среды, содержащей 0,25 М раствор сахарозы, 0,01 М трис-НСl-буфер ($pH=7,5$) (1000 г, 10 мин, $t=0+2^{\circ}C$) [3]. Активность альдегиддегидрогеназы определяли по методу Б.М. Кершенгольц, Л.П. Ильиной с 5 мМ ацетальдегидом в качестве субстрата по наработке НАДН [6]. Концентрацию белка вычисляли по методу Лоури в модификации [13].

Из первичных экспериментальных данных полной кинетической кривой зависимости продукта реакции от времени (V от t), используя математический метод, рассчитывали следующие кинетические характеристики АлДГ: Kt , V_{max} , V_{max}/Kt (Ka), где: Kt – время достижения $\frac{1}{2} V_{max}$ ферментативной реакции (мин); V_{max} – максимальная скорость накопления продукта реакции (мкмоль/мин); V_{max}/Kt (Ka) – коэффициент каталитической эффективности ферментативной реакции (мкмоль/мин²) [5]. Учитывая, что с течением времени кинетическая характеристика фермента в надмолекулярной структуре может изменяться, был выбран диапазон времени на кинетической кривой, при котором имеет место преимущественно пропорциональное изменение скорости реакции от времени при сохранении насыщающих концентраций исходных субстратов, равный 60 сек.

Результаты исследований обрабатывали с использованием t -критерия Стьюдента [2]. Обработку данных осуществляли на компьютере с помощью программы Biostat. При расчете t -критерия Стьюден-

та применяли поправку Бонферрони, позволяющую устранить ошибку первого рода, возникающую при сравнении более чем двух выборок данным методом.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты показали, что общая активность альдегиддегидрогеназы в исследуемых органах здоровых крыс (в порядке ее уменьшения) распределяется следующим образом: печень → почки → сердце → легкие (рис.).

У крыс с термической травмой на 3-и и 7-е сутки после ожога наибольшая общая активность АлДГ регистрируется в почках, наименьшая – в легких. Распределение общей активности альдегиддегидрогеназы на 10-е сутки после термической травмы в исследуемых органах аналогично распределению фермента контрольной группы крыс.

При ожоге общая активность АлДГ (3-и, 7-е, 10-е сутки после травмы) в поч-

ках статистически значимо не отличается от активности фермента контрольной группы крыс, отмечена лишь тенденция к снижению общей активности альдегиддегидрогеназы на 3-и и 7-е сутки после поражения. В печени общая активность АлДГ статистически значимо уменьшается на 3-и сутки после ожога на 61,4% ($p=0,0207$), на 7-е сутки – на 79,2% ($p=0,0104$), на 10-е сутки – на 28,7% ($p=0,0361$) по сравнению с интактными животными. В легких общая активность альдегиддегидрогеназы также снижается на 47,4% ($p=0,0415$) (3-и сутки после травмы) и 52,6% ($p=0,0087$) (7-е сутки после ожога), оставаясь в пределах значений контрольной группы крыс на 10-е сутки при термической травме. В сердце общая активность АлДГ уменьшается на 3-и сутки после поражения на 33,3%; на 7-е и 10-е сутки после ожога не выявлено статистически значимых изменений активности фермента (рис.).

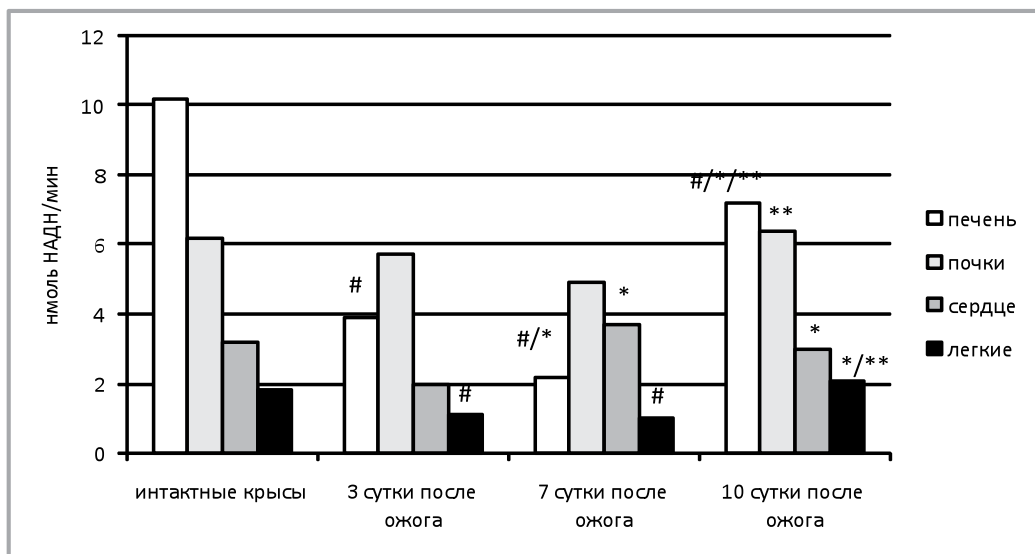


Рис. Общая активность альдегиддегидрогеназы в норме и при ожоге.

Примечание: # – статистически значимо по сравнению с контрольными крысами ($p \leq 0,05$); * – статистически значимо по сравнению с ожогом (3-и сутки); ** – статистически значимо по сравнению с ожогом (7-е сутки).

Перераспределение общей активности альдегиддегидрогеназы на 3-и и 7-е сутки после термической травмы сопровождается более значимым увеличением удельной активности фермента в почках и снижением удельной активности АлДГ в печени (табл. 1).

та каталитической эффективности в 2,4 раза ($p=0,0045$), а также статистически значимым снижением показателя K_t в 2,2 раза ($p=0,0032$), свидетельствуя о повышении сродства фермента к субстрату (табл. 2).

В сердце активность АлДГ на 3-и

Таблица 1

Удельная активность альдегиддегидрогеназы (нмоль НАДН/минхмг белка) в органах контрольных животных и крыс с ожогом

Орган	Контрольные крысы	Крысы с ожогом		
		3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки
Печень	51,39±1,75	22,49±1,30#	11,25±0,84#/*	30,10±3,46#/**
Сердце	15,55±1,43	13,00±2,13	16,20±1,89	26,45±1,67#/**
Почки	80,50±5,55	98,04±6,71#	87,05±8,27	117,10±9,25#/**
Легкие	22,61±2,10	14,46±1,79#	10,07±0,83#/*	22,10±1,20**

Примечание: # – статистически значимо по сравнению с контрольными крысами ($p \leq 0,05$); * – статистически значимо по сравнению с ожогом (3-и сутки) ($p \leq 0,05$); ** – статистически значимо по сравнению с ожогом (7-е сутки) ($p \leq 0,05$).

Удельная активность альдегиддегидрогеназы в почках статистически значимо возрастает на 3-и сутки после ожога на 21,8% ($p=0,0246$), на 10-е сутки после поражения – на 45,5% ($p=0,0123$) по сравнению с активностью фермента контрольной группы животных. Следует отметить преобладание общей активности альдегиддегидрогеназы и повышение удельной активности фермента в почках во все исследуемые периоды, что свидетельствует о возрастании детоксикационной функции данного органа.

На 3-и сутки после поражения в почках уменьшается максимальная скорость накопления продукта альдегиддегидрогеназной реакции в 1,6 раза ($p=0,0217$) по сравнению с контрольными животными. Увеличение активности АлДГ в почках на 10-е сутки после ожога, вероятно, обусловлено возрастанием коэффициен-

та и 7-е сутки после ожога находится в пределах значений контрольной группы животных. Статистически значимое повышение удельной активности фермента, следовательно, вовлечение в процесс биотрансформации альдегидов в данном органе выявлено лишь на 10-е сутки после травмы на 70,1% ($p=0,0024$). Рост активности альдегиддегидрогеназы именно в этот временной промежуток, вероятно, можно объяснить наступлением третьей фазы эндогенной интоксикации, которая характеризуется проникновением токсичных соединений в клетки особенно тех органов, которые не предназначены для осуществления детоксикации [7]. Кроме этого, на 10-е сутки в сердце возрастает сродство АлДГ к субстрату реакции: статистически значимо уменьшается время достижения $\frac{1}{2} V_{max}$ ферментативной реакции в 2,7 раза ($p=0,0038$), понижается

максимальная скорость накопления продукта альдегиддегидрогеназной реакции в 2,7 раза ($p=0,0064$) (табл. 2).

Известно, что тяжелая термическая травма осложняется ранним развитием синдрома полиорганной недостаточности [7]. Результаты проведенного исследования показали, что при ожоге удельная активность альдегиддегидрогеназы статистически значимо снижается только в печени и легких: на 3-и сутки после травмы – на 56,2% в печени ($p=0,0056$) и на 36,1% в легких ($p=0,0365$); на 7-е сутки – на 78,1% в печени ($p=0,0042$) и на 55,5% в легких ($p=0,0154$) и на 10-е сутки после поражения – на 41,4% в печени ($p=0,0116$). Падение удельной и общей активности альдегиддегидрогеназы в печени и легких у крыс с термической

травмой, возможно, связано с увеличением содержания высокотоксичных соединений, в частности – молекул средней молекулярной массы (МСМ). Видимо, МСМ, связываясь с ферментом, переводят его в новое конформационное состояние, которое характеризуется снижением сродства фермента к субстрату реакции [4]. Об этом косвенно может свидетельствовать и увеличение времени достижения половины V_{max} фермента у опытных животных (табл. 2). Время достижения $\frac{1}{2} V_{max}$ ферментативной реакции в легких характеризуется повышением в 1,3 раза ($p=0,0187$) на 7-е сутки после травмы и снижением коэффициента каталитической эффективности АлДГ в 2 раза ($p=0,0327$). Из табл. 2 видно, что K_t печени на 3-и сутки после термической

Таблица 2

Кинетические характеристики альдегиддегидрогеназы в органах контрольных крыс и животных с ожогом

Показатель		Интактные крысы	Крысы с ожогом		
			3-и сутки	7-е сутки	10-е сутки
Kt, мин	печень	1,14±0,06	3,96±0,08#	7,58±0,74#/*	2,00±0,08#/**
	легкие	1,58±0,20	1,80±0,05	2,00±0,01#/*	1,77±0,08
	почки	1,72±0,07	1,71±0,04	1,68±0,07	0,79±0,08#/**
	сердце	4,66±0,82	5,60±0,08	3,00±0,19*	1,72±0,05#/**
Vmax, мкмоль/мин	печень	0,55±0,03	1,41±0,09#	2,44±0,44#/*	0,42±0,04#/**
	легкие	0,13±0,02	0,11±0,03	0,10±0,01	0,31±0,05#/**
	почки	0,36±0,02	0,23±0,01#	0,31±0,06	0,30±0,02
	сердце	1,95±0,15	2,45±0,04#	1,03±0,08#/*	0,72±0,03#/**
Ka, мкмоль/мин ²	печень	0,51±0,04	0,38±0,03	0,32±0,03#	0,22±0,02#/**
	легкие	0,08±0,01	0,07±0,01	0,04±0,00#	0,18±0,01#/**
	почки	0,23±0,01	0,18±0,01	0,27±0,03*	0,54±0,01#/**
	сердце	0,41±0,06	0,45±0,01	0,34±0,04*	0,46±0,05

Примечание: # – статистически значимо по сравнению с контрольными крысами ($p \leq 0,05$); * – статистически значимо по сравнению с ожогом (3-и сутки) ($p \leq 0,05$); ** – статистически значимо по сравнению с ожогом (7-е сутки) ($p \leq 0,05$).

травмы статистически значимо увеличивается в 3,5 раза ($p=0,0023$), на 7-е сутки – в 6,6 раза ($p=0,0008$) и на 10-е сутки – в 1,7 раза ($p=0,0275$) по сравнению с контрольными животными, свидетельствуя о снижении сродства альдегиддегидрогеназы к субстрату реакции. Максимальное увеличение K_t наблюдается в печени и легких на 7-е сутки, вызывая наибольшее снижение удельной активности фермента. При термической травме во все исследуемые периоды после поражения в печени отмечается уменьшение коэффициента каталитической эффективности ферментативной реакции: на 3-и сутки – в 1,3 раза; на 7-е сутки – в 1,6 раза ($p=0,0271$); на 10-е сутки – в 2,3 раза ($p=0,0083$).

Уменьшение активности АлДГ ведет к накоплению большого количества альдегидов, которые, в свою очередь, токсичны для организма обожженных крыс и, ингибируя активность многих ферментов, снижают детоксикационную функцию печени – органа, являющегося основным местом нейтрализации ксенобиотиков. Предположительно, что понижение способности печени инактивировать токсические вещества при ожогах может быть одной из причин увеличения их количества в крови и способствовать развитию синдрома эндогенной интоксикации [7].

Согласно литературным данным, всякая ожоговая травма, даже не смертельная, вызывает ряд изменений печеночных клеток. При тяжелых ожогах, естественно, процесс этот затягивается еще больше [9]. В условиях функциональной и структурной неполноценности печеночных клеток любая дополнительная нагрузка – нарушения кровообращения и возникающая при этом гипоксия, перегрузка печени распадающимися

эритроцитами при переливании консервированной крови или на почве гемолиза при сепсисе – может способствовать усилению повреждения печеночных клеток [7]. В них возникает ряд структурных изменений. Повреждения при недостаточности механизмов компенсации завершаются тяжелыми нарушениями функции органа.

Заключение

Таким образом, термическая травма приводит к изменению удельной и перераспределению общей активности АлДГ. Характер возникающих изменений зависит от органа и определяется временем после ожога.

Показано, что при термической травме происходит изменение распределения общей активности альдегиддегидрогеназы в печени, почках, сердце и легких по сравнению с контрольными животными: при ожоге наибольшая общая активность АлДГ приходится на почки, наименьшая – на легкие (3-и и 7-е сутки после травмы).

При термической травме происходит разнонаправленное изменение удельной активности АлДГ: уменьшение – в печени и легких, увеличение – в почках и сердце. Наиболее статистически значимое понижение удельной активности альдегиддегидрогеназы в легких и печени наблюдается на 7-е сутки после повреждения, повышение в сердце и почках – на 10-е сутки, по сравнению с контрольными животными.

Снижение общей и удельной активности альдегиддегидрогеназы в печени на 3-и, 7-е и 10-е сутки после травмы свидетельствует о том, что при ожоге страдает в большей степени данный орган детоксикации. Установлено, что под влиянием термической травмы изменяются каталитические и кинетические характери-

стики альдегиддегидрогеназы, что важно учитывать при разработке методов борьбы с интоксикацией.

Список литературы

1. **Болтовская В.В.** Патоморфология раневого процесса в зоне глубокого ожога кожи в условиях применения низкоинтенсивного электромагнитного излучения // Автореф. дисс. канд. наук. ГОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет. Саратов. 2006. 21 с.
2. **Гланц С.** Медико-биологическая статистика (пер. с англ.). - М.: Практика. 1999. 459 с.
3. **Ещенко Н.Д.** Выделение митохондриальной и цитоплазматической фракций тканей для анализа активности ферментов. - В кн.: Методы биохимических исследований. - Ленинград: Издательство Ленинградского ун-та. 1982. С. 29-33.
4. **Зимин Ю.В., Соловьева А.Г.** Возможный механизм действия «термотоксинов» на кинетические свойства альдегиддегидрогеназы печени при экспериментальном термическом поражении // Вестник Российской военно-медицинской академии. Т. 29. 2010. № 1. С. 43-44.
5. **Зимин Ю.В., Соловьева А.Г., Уланова А.А.** Оценка кинетических параметров ферментов в гетерогенной надмолекулярной системе // Фундаментальные исследования. 2013. № 2. С. 68-71.
6. **Кершенгольц Б.М., Ильина Л.П.** Биологические аспекты алкогольных патологий и наркоманий. - Якутск: Издательство ЯГУ. 1998. 150 с.
7. **Козинец Г.П., Слесаренко С.В., Радзиховский А.П., Повстяной Н.Е., Шейман Б.С.** Ожоговая интоксикация. Патогенез, клиника, принципы лечения. - М.: МЕДпресс-информ. 2005. 321 с.
8. **Марусянов В.Е., Михайлович В.А., Доманская И.А.** Характеристика стадий эндогенной интоксикации // Эфферентная терапия. Т. 1. 1995. № 2. С. 26-30.
9. **Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г.** Ожоги. Руководство для врачей. - СПб.: СпецЛит. 2000. 467 с.
10. **Lieber C.S.** Hepatic and other medical disorders of alcoholism: From pathogenesis to treatment // J. Stud. Alcohol. Vol. 59. 1998. № 1. P. 9-25.
11. **Reichard J.F., Vasiliou V., Petersen D.R.** Characterization of 4-hydroxy-2-nonenal metabolism in stellate cell lines derived from normal and cirrhotic rat liver // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1487. 2000. № 2-3. P. 222-232.
12. **Townsend A.J., Leone-Kabler S., Haynes R.L.** Selective protection by stably transfected human ALDH3A1 (but not human ALDH1A1) against toxicity of aliphatic aldehydes in V79 cells // Chem. Biol. Interact. Vol. 130-132. 2001. № 1-3. P. 261-273.
13. **Waterborg J.H., Matthews H.R.** The Lowry method for protein quantitation // Methods Mol. Biol. Vol. 32. 1994. P. 1-4.

Features of the catalytic and kinetic properties of aldehyde dehydrogenase to the vital organs in experimental thermal injury

A.G. Solov`eva

The catalytic and kinetic properties of aldehyde dehydrogenase (ALDH) have been studied in the various organs of the experimental burns injury. The boiling water burn (20%) were caused to rats Wistar under ether anaesthesia, exposure – 3 sec. The animals were taken out of the experiment on the third, seventh and tenth day after the injury. Activity of aldehyde dehydrogenase and the concentration of the protein were determined in the homogenate of tissues (liver, kidney, heart and lungs). Of primary experimental data total kinetic curve of dependence of reaction product from the time were counted kinetic characteristics of ALDH (K_t , V_{max} , V_{max}/K_t). It was established that the thermal injury, the redistribution of overall aldehyde dehydrogenase activity between the liver, kidneys, heart and lungs is, in comparison with the control animals: when burning the highest total activity of ALDH is observed in the kidneys, the lowest - in the lungs (3, 7 days after the injury). Decrease of specific aldehyde dehydrogenase activity was revealed in the liver and the lungs (the most expressed on a 7 days after thermal damage), reduction in the rate of catalytic efficiency of ALDH and the increase in time of reaching $\frac{1}{2} V_{max}$ of enzymatic reaction. Increase of the specific activity of the enzyme was noted in the kidneys and the heart (the maximum of the 10-th day), due to the increase of the coefficient of catalytic efficiency and affinity of the enzyme to the substrate. The fall of general and specific activity of the aldehyde dehydrogenase in the liver to 3, 7 and 10 days after the burn indicates the greatest damage to the organ with thermal injury.

Key words: aldehyde dehydrogenase, experimental thermal injury, organ specific.



Особенности распределения металлов в организме лабораторных животных при разных уровнях их пищевого потребления

А.О. Ревякин¹, Н.Н. Каркищенко¹, Е.Б. Шустов¹, В.Н. Каркищенко¹,
Д.А. Ксенофонтов², Н.В. Касинская¹

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

² – РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

Контактная информация: к.б.н. Ревякин Артем Олегович, ar_info@mail.ru

Методом атомно-абсорбционной спектроскопии оценено содержание кальция, магния, железа, меди, марганца и цинка в тканях лабораторных животных при уровнях пищевого потребления, составляющих 100, 120 и 140% от суточной потребности. Установлено, что избыточное пищевое потребление металлохелатов в течение 28 дней не вызывает их значимой кумуляции в организме. Высказано предположение о существовании особых механизмов ускоренной элиминации некоторых металлохелатов (марганец, медь, цинк) при повышенном уровне их поступления в ЖКТ.

Ключевые слова: металлохелаты, микроэлементы, содержание в тканях, атомно-абсорбционная спектроскопия.

Введение

Одним из серьезных научных достижений второй половины XX века является установление роли металлоферментов и микроэлементов в эффективной жизнедеятельности организма человека. Современные витаминные препараты, различные комплексы для коррекции метаболизма у здоровых и больных людей содержат большое разнообразие солей металлов.

В отношении многих металлов к настоящему времени разработаны нормы суточного потребления для практически здоровых людей, имеются отдельные рекомендации для частных клинических

патологий (например, для кальция при патологии костной ткани, железа – при нарушениях кроветворения, цинка – при нарушениях в иммунной системе) [1]. В то же время особенности распределения металлов в тканях при разных уровнях пищевого потребления, вопросы их взаимодействия в организме человека, в т.ч. – возможной конкуренции на этапах фармакокинетики, остаются недостаточно подробно изученными.

Цель исследования – изучить особенности содержания кальция, меди, марганца, железа, магния и цинка в тканях животных при кумулятивном избыточном потреблении.

Материалы и методы

Исследование планировалось и проводилось в соответствии с требованиями ГОСТ 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и РД 64-126-91 «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств». Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией НЦБМТ ФМБА России.

Исследование выполнялось на лабораторных белых аутбредных крысах, полученных из филиала «Андреевка» НЦБМТ ФМБА России. Карантин, содержание, осмотры, разделение животных на группы, введение препаратов и эвтаназия регламентировались утвержденными стандартными операционными процедурами (СОП) организации [5]. Критериями включения животных в исследование были: пол, возраст, масса тела, отсутствие признаков заболевания.

Кормление животных осуществлялось стандартным экструдированным гранулированным полнорационным комбикормом для лабораторных животных ПК-120, произведенным в соответствии с ГОСТ Р 51849-2001 Р.5, ad libitum, исходя из суточных нормативов. Очищенная водопроводная вода давалась всем животным ad libitum в стандартных поилках.

В суточной дозе комбикорма (из расчета на одну крысу массой 250 г) содержалось: кальция – 54 мг; железа – 0,54 мг; цинка – 0,136 мг; марганца – 0,27 мг; меди – 0,072 мг; магния – 0,8 мг; кобальта – 0,0054 мг [3].

Так как в исследовании планировалось изучение содержания металлов в тканях животных при избыточном их поступлении, то дополнительное количество металлов, обеспечивающее превышение суточной нормы потребления на 20 и 40%, вводилось животным в виде

смеси хелатных комплексов, ежедневно, однократно, внутривенно с помощью зонда, в 0,1 мл водного раствора, на протяжении 28 дней.

Животные выводились из эксперимента методом декапитации с отбором проб крови и тканей. Ткани высушивались в сушильном шкафу при температуре +105°C до достижения постоянной сухой массы, затем озолялись в муфельной печи при температуре +850°C. Навески золы растворяли в два раза дистиллированной воде и определяли содержание металлов методом атомно-абсорбционной спектроскопии с помощью прибора «Спектр 5-4» (производство ОАО «Союзцветметавтоматика», Россия; № Государственного реестра средств измерений 13743-04). Полученные количественные результаты измерений из зольных навесок пересчитывались в содержание металлов в тканях (мг/100 г сухого вещества ткани).

Исследуемые металлохелатные комплексы были получены путем совместной инкубации при комнатной температуре и pH=7,1-7,2 водных растворов солей металлов с низкомолекулярной фракцией (<10 кД) ферментативных гидролизатов сывороточных белков молока [4]. Жидкие хелаты лиофильно высушивали и определяли в них содержание металлов атомно-абсорбционным методом.

В работе исследовалось содержание металлов в следующих тканях: кровь (суммарно плазма и форменные элементы), печень, кости (включая костный мозг), волосы, мышцы, кишечник (включая кишечное содержимое). Выбранные для исследования ткани, с одной стороны, отражают специфичность депонирования и органотропность действия металлов [2, 6], а с другой – позволяют косвенно характеризовать этапы их фар-

макокинетики (всасывание в кишечнике, поступление после всасывания по порտальной системе в печень, формирование плазменных, эритроцитарных и тканевых депо).

О динамике интегрального содержания того или иного металла в организме животных при различных уровнях пищевого потребления судили по сумме показателей для разных тканей. Это же значение использовалось для расчета структуры распределения металлов по тканям.

Достоверность различий между показателями оценивалась по F-критерию однофакторного дисперсионного анализа. Для оценки степени связи между показателями рассчитывался ранговый коэффициент корреляции по Спирмену.

В соответствии с процедурой рандомизации были сформированы 3 равноценные группы животных (контрольная и 2 опытных) по 10 особей в каждой. Первой и второй опытным группам животных дополнительно к суточному питанию вводили дозы хелатного комплекса, обеспечивающие превышение суточных норм потребления металлов на 20 и 40% соответственно. Контрольным животным вводили эквивалентное количество физиологического раствора.

Результаты и их обсуждение

Начальная масса животных во всех группах равнялась 208 ± 5 г. Прирост этого показателя происходил равномерно и за период исследования (28 дней) составил, в среднем, 40 г.

В табл. 1 представлены данные об изменениях интегрального содержания анализируемых металлов (средние по группам) при разных уровнях их пищевого потребления.

Анализ табл. 1 показывает, что увеличение уровня пищевого потребления

металлов неоднозначно сказывается на интегральном показателе их содержания в организме. Так, увеличение потребления кальция на 20% сопровождается повышением его содержания в организме только на 6% ($p=0,02$). Для цинка этот эффект выражен несколько слабее (4%) и находится на уровне статистических тенденций ($p=0,06$).

Данное повышение уровня пищевого потребления меди, железа и магния не приводило к заметным сдвигам в содержании этих металлов в организме. В то же время увеличение пищевого потребления марганца на 20% сопровождалось снижением показателя его интегрального содержания в организме на треть (66%, $p=0,0005$). Полученные результаты могут быть объяснены, если предположить существование механизма ускоренного выведения металлов из организма при превышении какого-либо порогового их уровня в кишечнике. Подобный механизм (при более высоком уровне порога срабатывания) может объяснить и наблюдаемое снижение (не взирая на более высокий уровень пищевого потребления, равный 140% от рекомендуемого) интегрального показателя содержания в организме таких металлов как кальций (89%, $p=0,0001$) и цинк (возврат к значениям при обычном уровне потребления).

Необходимо отметить, что для железа, вероятно, существует несколько иной механизм реакции на превышение его поступления с пищей, так как при уровне потребления этого металла в 140% от рекомендуемой нормы его содержание в организме будет соответствовать уровню потребления (+42%, $p=0,0002$). Ни для какого другого из исследованных металлов нами не было получено увеличение содержания их в организме, близкое к

Таблица 1

Влияние уровней пищевого потребления на интегральное содержание металлов в организме крыс (средние по группе, $M \pm m$)

Металл	Интегральное содержание металлов в организме по уровням потребления		
	F1 (100%), контроль	F2 (120%)	F3 (140%)
Са, мг/100 г ткани % р	1781±27 100	1896±35 106 p=0,02	1578±31 89 p=0,0001
Си, мг/100 г ткани % р	6,79±0,15 100	6,96±0,38 102 p=0,68	6,50±0,16 96 p=0,19
Мп, мг/100 г ткани % р	9,64±0,43 100	6,33±0,69 66 p=0,0005	10,48±0,59 109 p=0,25
Fe, мг/100 г ткани % р	361,7±18,7 100	328,5±12,1 91 p=0,15	513,9±26,9 142 p=0,0002
Mg, мг/100 г ткан % р	67,54±0,82 100	66,95±0,98 99 p=0,71	73,22±1,06 108 p=0,0004
Zn, мг/100 г ткани % р	39,44±0,39 100	41,09±0,72 104 p=0,06	39,26±0,72 100 p=0,81

уровню превышения рекомендованных дисперсионного анализа значений ткане- норм потребления. ного содержания металлов по фактору

В табл. 2 представлены результаты «Уровень пищевого потребления».

Таблица 2

Результаты дисперсионного анализа тканевого содержания металлов по фактору «Уровень пищевого потребления»

Металл	Ткань	Центроиды распределения (мг/100 г ткани) по уровням потребления			Кoeffициент детерминации модели, D	Уровень значимости, p
		F1 (100%), контроль	F2 (120%)	F3 (140%)		
Кальций	Кровь	3,81	4,34	2,92	0,66	$5 \cdot 10^{-7}$
	Печень	2,72	2,39	2,41	0,08	0,33
	Кость	1667	1822	1442	0,73	$2 \cdot 10^{-8}$
	Волосы	4,29	6,45	3,53	0,79	$7 \cdot 10^{-10}$
	Мышцы	9,68	18,88	17,93	0,84	$2 \cdot 10^{-11}$
Медь	Кишечник	93,11	42,11	110,15	0,81	$1 \cdot 10^{-10}$
	Кровь	0,82	0,87	0,88	0,01	0,85
	Печень	1,42	1,64	1,43	0,04	0,59
	Кость	1,22	1,66	1,04	0,86	$4 \cdot 10^{-12}$
	Волосы	1,54	1,44	1,11	0,31	0,007
	Мышцы	0,34	0,46	0,36	0,54	$3 \cdot 10^{-5}$
	Кишечник	1,44	0,88	1,16	0,57	$1 \cdot 10^{-5}$

Марганец	Кровь	0,11	0,09	0,09	0,02	0,76
	Печень	0,56	0,59	0,46	0,43	0,0005
	Кость	0,52	0,97	0,63	0,39	0,0013
	Волосы	0,14	0,23	0,15	0,40	0,001
	Мышцы	0,10	0,07	0,07	0,12	0,17
Железо	Кишечник	8,18	4,37	9,06	0,60	$5 \cdot 10^{-6}$
	Кровь	196,5	167,7	320,4	0,52	$5 \cdot 10^{-5}$
	Печень	90,6	105,8	117,6	0,32	0,006
	Кость	12,55	14,04	17,74	0,20	0,05
	Волосы	4,27	7,27	2,83	0,78	$2 \cdot 10^{-9}$
Магний	Мышцы	8,31	8,80	6,97	0,28	0,012
	Кишечник	49,3	24,9	48,4	0,71	$5 \cdot 10^{-8}$
	Кровь	1,94	1,73	1,79	0,16	0,09
	Печень	5,85	6,26	7,37	0,70	$8 \cdot 10^{-7}$
	Кость	34,7	36,7	33,8	0,31	0,007
Цинк	Волосы	1,73	2,28	1,94	0,46	0,0002
	Мышцы	8,04	8,91	8,10	0,29	0,009
	Кишечник	15,24	11,08	20,16	0,61	$3 \cdot 10^{-6}$
	Кровь	2,48	2,32	2,47	0,02	0,80
	Печень	4,11	4,13	3,44	0,14	0,14
	Кость	20,15	22,85	18,68	0,49	0,0001
	Волосы	3,17	3,11	3,90	0,09	0,26
	Мышцы	2,98	3,49	3,19	0,55	$2 \cdot 10^{-5}$
	Кишечник	6,56	5,18	7,58	0,44	0,0004

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что для основной массы изученных показателей содержания металлов в тканях фактор «Уровень пищевого потребления» является статистически значимым. Однако динамика центроидов облаков рассеивания значений в большинстве случаев не является монотонной (т.е. увеличение уровня пищевого потребления не сопровождается увеличением содержания металла в тканях), что отражает сложность и неоднозначность механизмов фармакокинетики этих соединений. В основном, монотонная динамика центроидов была характерна для содержания железа в печени и костной ткани, а также для магния в печени.

Обращает на себя внимание тот факт,

что в отношении **крови** только для кальция фактор «Уровень пищевого потребления» был статистически значимым. У остальных металлов их содержание в крови не зависело от уровня пищевого потребления, что отражает особую гомеостатическую регуляцию химического состава крови. Фактор «Уровень пищевого потребления» для **печени** был значим (в порядке убывания значимости) у магния, марганца, железа; для **костной ткани** – у меди, кальция, цинка, марганца, магния, железа; для **волос** – у кальция, железа, магния, марганца, меди, но не у цинка; для **мышц** – у кальция, цинка, меди, магния, железа, но не у марганца. Для **кишечника**, с учетом пищевого поступления металлов в организм, все ис-

следуемые металлы были чувствительны к фактору «Уровень пищевого потребления»: в большей степени это касалось кальция, железа, марганца и магния; в меньшей – меди и цинка. Отмеченное повышение содержания металлов в кишечнике при уровне его потребления в 140% по сравнению с контрольной группой, возможно, обусловлено не только снижением скорости абсорбции, но и образованием в химусе трудно растворимых, не абсорбируемых соединений цинка с кальцием и медью.

На скорость всасывания металлов в кишечнике может оказывать влияние и кальций-магниевое соотношение, регулирующее конкурентное взаимодействие между этими металлами, в т.ч. на уровне транспортных белков и механизмов энтеральной абсорбции. Так, для кишечника кальций-магниевый коэффициент снижается при избыточном потреблении металлов с 6,1 (уровень потребления 100%) до 3,8 (уровень потребления 120%) с частичным восстановлением до 5,4 при уровне потребления 140%.

Важной характеристикой присутствия микроэлементов в организме является структура их тканевого распределения. В табл. 3 представлены данные, характеризующие распределение металлов по анализируемым тканям в зависимости от уровня их пищевого потребления.

Анализ табл. 3 показывает, что основная часть пищевого **марганца** остается в кишечнике, и существенное (на 40%) увеличение его потребления практически не приводит к изменению распределения этого металла в организме. В то же время при умеренном повышении его пищевого потребления (+20% к рекомендуемым дозам) включаются механизмы, облегчающие его всасывание (снижение содержания в кишечнике при повышении уровня содержания в крови) и перераспределение по организму (увеличение содержания в костях и печени). Содержание **кальция** в кишечнике самое низкое по сравнению с другими металлами. Основным органом депонирования этого металла является костная ткань (более 90% для всех изученных уровней потребления). Вероятно, существует особый механизм регулирования содержания кальция в крови, так как структура его распределения в организме остается неизменной (0,2%) при разных уровнях пищевого потребления. Кроме кальция, костная ткань (включающая костный мозг) является главным органом депонирования и для **магния**, и для **цинка**. Однако распределение этих металлов в организме, по сравнению с кальцием, является более равномерным, и содержание их в костях составляет не 90, а только 45-55%. Вторую по значимости группу тканей, где депонируется маг-

Таблица 3

Структура распределения металлов в тканях (%) в зависимости от уровня их пищевого потребления

Металл	Уровень потребления	Ткань					
		кровь	печень	кость	волосы	мышцы	кишечник
Кальций	F1 (100%)	0,2	0,1	94,0	0,2	0,5	5,0
	F2 (120%)	0,2	0,1	96,1	0,3	1,0	2,3
	F3 (140%)	0,2	0,1	91,3	0,2	1,1	7,1
Медь	F1 (100%)	12,1	21,0	18,1	22,7	5,0	21,1
	F2 (120%)	12,5	23,5	23,9	20,9	6,6	12,6
	F3 (140%)	13,6	22,1	16,0	17,1	5,6	25,6

Марганец	F1 (100%)	1,1	5,8	5,4	1,8	1,0	85,9
	F2 (120%)	1,4	9,4	15,3	3,7	1,7	69,1
	F3 (140%)	0,9	4,4	6,0	1,5	0,7	86,5
Железо	F1 (100%)	54,3	25,1	3,5	1,2	2,3	13,6
	F2 (120%)	51,1	32,2	4,3	2,2	2,7	7,6
	F3 (140%)	62,3	22,9	3,5	0,6	1,4	9,3
Магний	F1 (100%)	2,9	8,7	51,4	2,6	11,8	22,36
	F2 (120%)	2,6	9,4	54,8	3,4	13,3	16,5
	F3 (140%)	2,4	10,1	46,2	2,7	11,1	27,5
Цинк	F1 (100%)	6,3	10,4	51,2	8,0	7,5	16,6
	F2 (120%)	5,7	10,1	55,6	7,6	8,5	12,6
	F3 (140%)	6,3	8,8	47,6	9,9	8,1	19,3

ний и цинк, составляют мышцы и печень (содержание металлов находится в диапазоне 8-13%). Относительно равномерно в организме распределяется **медь** (с некоторым депонированием в печени, пик содержания находится в диапазоне 21-24%). Для **железа** основной тканью депонирования является кровь, причем при увеличении уровня пищевого насыщения железом на 40% происходит структурный сдвиг перераспределения металла по организму, и его доля в крови повышается с 51% при нормальном уровне пищевого потребления – до 61%.

Корреляционный анализ показал, что с уровнем пищевого потребления содержание металлов в тканях практически не связано (рис.). Из всего массива данных только для 4-х исследуемых показателей были получены достоверные коэффициенты корреляции с уровнем пищевого потребления:

- содержание железа в крови ($r=+0,55, p=0,04$);
- содержание железа в печени ($r=+0,56, p=0,04$);
- содержание магния в печени ($r=+0,81, p=0,006$);
- содержание кальция в мышцах ($+0,75, p=0,01$).

Следовательно, если возникает необходимость повысить сверх нормального уровня содержание железа в крови или печени, кальция в мышцах или магния в печени, то это может быть достигнуто путем повышения их пищевого потребления, причем чем больший прирост содержания металла необходим, тем более высокий уровень его пищевого потребления необходимо создать.

Выводы:

1. Повышение уровня пищевого потребления металлов не однозначно сказывается на их интегральном содержании в организме.

2. Изменения содержания металлов в тканях позволяют предположить, что в организме животных существует механизм их ускоренной элиминации при превышении пороговых величин содержания в кишечнике. Для кальция и цинка уровень срабатывания элиминационного механизма выше, чем для марганца, магния и меди.

3. Типовая динамика содержания железа при избыточном поступлении с пищей отличается от таковой других металлов. При превышении суточной потребности железа на 40% его содержание

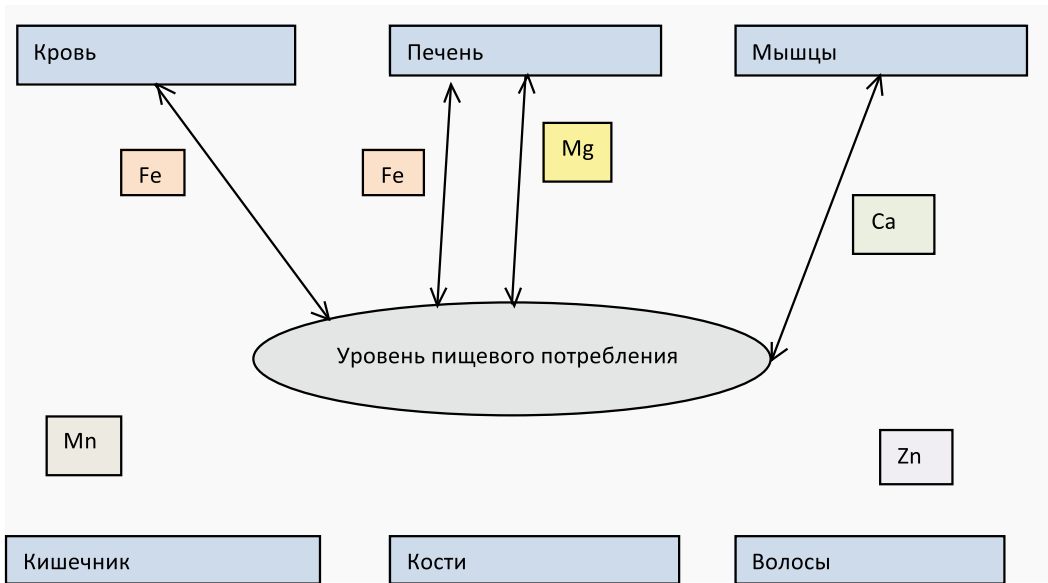


Рис. Граф корреляционных связей содержания металлов в тканях и уровня пищевого потребления.

в организме будет соответствовать уровню потребления.

4. Содержание металлов в крови животных (кроме железа) практически не зависит от уровня их пищевого потребления, что отражает особую гомеостатическую регуляцию химического состава крови.

5. Лучше всего всасываются в ЖКТ хелаты кальция, хуже всего – хелаты марганца.

6. Основные тканевые депо для металлов формируются в костной ткани (для кальция, магния, цинка); печени (для меди); крови (для железа). Повышенное содержание магния и цинка на фоне избыточного потребления отмечается также в печени и мышцах.

7. Выявлены достоверные корреляционные связи содержания железа в крови, железа в печени, магния в печени и кальция в мышцах с уровнем пищевого потребления этих металлов.

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. *Иванов А.А., Полякова Е.П., Ксенофонтов Д.А.* Общебиологический феномен депонирования катионов структурами химуса и его значение для создания смесей энтерального питания // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2012. № 2. С. 71-74.
3. *Кальницкий Б.Д.* Минеральные вещества и кормление животных. - Л.: Агропромиздат. 1985. 207 с.
4. *Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Люблинский С.Л., Капанадзе Г.Д., Шустов Е.Б., Ревякин А.О., Болотских Л.А., Касинская Н.В., Станкова Н.В.* Роль микроэлементов в спортивном питании и безопасность металлохелатов // Биомедицина. 2013. № 2. С. 12-41.

5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
6. *Шлыгин Г.К.* Межорганный обмен нутриентами и пищеварительная система. - М; Изд-во МГГУ. 1997. 136 с.

Features of distribution of metals in an organism of laboratory animals at different levels of their food consumption

A.O. Revyakin, N.N. Karkischenko, E.B. Shustov, V.N. Karkishenko, D.A. Ksenofontov, N.V. Kasinskaya

The content of calcium, magnesium, iron, copper, manganese and zinc in tissues of laboratory animals at levels of food consumption, comprising 100, 120 and 140% of the daily requirement evaluated by atomic absorption spectrometry. It is found that excess food intake metalchelates for 28 days doesn't cause their significant accumulation in an organism. Suggested the existence of specific mechanisms for the accelerated elimination of some metalchelates (manganese, copper, zinc) at an elevated level of their income in the digestive tract.

Key words: metalchelates, microcells, content in tissues, atomic absorption spectrometry.



Метод культивации и фенотипическая характеристика гемопоэтических клеток костного мозга (мононуклеарной фракции) от доноров с геном зеленого белка

О.И. Степанова, Н.В. Касинская, О.В. Баранова, Х.Х. Семенов,
А.О. Ревякин

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская обл.

Контактная информация: к.б.н. Степанова Ольга Ивановна, olgsima50@mail.ru

Отработан метод раздельного выделения из костного мозга гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток от здоровых доноров с геном зеленого белка, отработан метод культивирования с фенотипированием их в культуре.

Ключевые слова: клетки костного мозга, гемопоэтическая фракция, ген зеленого белка.

В последние 30 лет в России, так же как и во всем мире, стали отчетливо проявляться тревожные тенденции старения населения, неуклонного роста хронических заболеваний и инвалидизации людей трудоспособного возраста. Затраты на лечение, реабилитацию и социальную поддержку такого контингента больных ложатся тяжелым бременем на государственный бюджет и поглощают значительную часть средств, ежегодно выделяемых на здравоохранение. Указанные обстоятельства настоятельно требуют совершенствования современной системы здравоохранения, которая в значительной степени может быть достигнута благодаря освоению и внедрению в клиническую практику новых, бо-

лее эффективных и доступных методов восстановительного лечения больных. Приступив к изучению возможности применения стволовых и прогениторных клеток костного мозга в восстановительной медицине, мы убедились в том, что биологические возможности клеточной терапии стволовыми клетками вообще остаются еще мало изученными. В частности, в литературе отсутствуют четкие представления о различиях в технологии культивирования гемопоэтических и мезенхимальных (стромальных) стволовых клеток костного мозга перед пересадкой, не отработаны воспроизводимые технологические режимы для фибробластоподобной дифференцировки стромальной фракции стволовых клеток

костного мозга, а также не изучена эффективность применения и аллогенных, и изогеннаутологичных (в сравнении) пре-дифференцированных стволовых клеток для восстановления структуры и функции соответствующих пораженных органов.

Цель исследования – разработать технологические режимы культивирования и дать фенотипическую характеристику стволовым и прогениторным клеткам костного мозга. Идентифицировать их и использовать для восстановления структуры и функции соответствующих пораженных органов в модельных опытах на животных.

Задача исследования – отработать технологию раздельного выделения из костного мозга гемопоэтических стволовых клеток и фенотипировать их в культуре.

Материалы и методы

Эксперименты на животных проводились по двум основным направлениям: по пути отработки технологии культуральных исследований (выделения клеток, приготовления клеточных культур), а также по пути исследования терапевтических возможностей полученных клеточных культур.

В качестве доноров стволовых и прогениторных клеток костного мозга мы использовали здоровых доноров: трансгенных мышей линии B10.GFP (n=30) с геном зеленого белка для маркировки введенных клеток в организм реципиента и фенотипически здоровых гетерозиготных мышей db/+ (n=30) для осуществления изогенной трансплантации. Использование изогенных клеток костного мозга (ККМ) от здоровых доноров вместо аутологичных ККМ было связано с тем, что последние у животных

с длительной хронической патологией в организме утрачивают свою биорегуляторную активность и становятся мало пригодными для клеточной терапии.

Технология проведения культуральных исследований

Все работы по выделению клеток и их культивированию проводились в соответствии с общими принципами культуральных исследований на живых и трупных донорах (срок гибели животных 30-40 мин.). Исследовали жизнеспособность клеток гемоэтической и стромальной фракций ККМ по окраске трипановым синим, а также пролиферативную активность в культуре стромальных ККМ по скорости образования монослоя.

Получение и ведение культур гемопоэтических (мононуклеарной фракции) клеток костного мозга (ГПКМ)

Забор клеток костного мозга проводили у мышей-доноров под эфирным наркозом. Стерильно иссекали кости предплечья, плеча, голени и бедра вместе с суставами и отделяли их от мышц. Далее кости обрабатывали в 70% спирте, стерильно ножницами отсекали суставы и с помощью шприца (1мл и 2мл), вымывали ККМ раствором Хенкса (без Ca^{+2} и Mg^{+2}) из костномозгового канала. Полученную суспензию клетками центрифугировали вместе с Ficoll-P (удельная плотность $1,077г/см^3$) для градиентного разделения в течение 5 мин при 1500 об/мин и комнатной температуре $t^{\circ}=(22^{\circ}C)$. Затем надосадочную фазу удаляли путем отсасывания. Отмытую полученную интерфазу клеток мононуклеарной фракции ресуспендировали в питательной ростовой среде DMEM (ПанЭко), содержащей 25мМ NEPES; 0,58 г/л глутамина; 100мкг/л гентамицина; 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, USA); 5 мкг/л

инсулина. Клетки культивировали во флаконах при +37°C в CO₂-инкубаторе, атмосфере с 5% CO₂ и 95% влажности в течение 4-х и 5-ти суток. Через 4-5 суток культура ККМ мышей содержала до 50% свободно плавающих в суспензии с питательной средой, округлых неприкрепившихся гемопоэтических клеток на разных сроках дифференцировки (гемопоэтические клетки, лимфоциты, моноциты) и до 50% прикрепившихся к пластику распластанных фибробластоподобных клеток ММСК КМ (рис.). Неприкрепившиеся к пластику клетки отбирали и затем использовали в опытах на животных для трансплантации как очищенную от стромальных (пластикадгезивных) клеток моноклеарную фракцию гемопоэтических клеток. Полученная культура МНК, содержащая 2,5% CD34+/CD45+ клеток (табл.) была готова для трансплантации. От одного донора получали, в среднем, 40-60 млн МНК для трансплантации

выявляли на проточном цитофлуориметре FC-500 (USA) с использованием комбинации крысиных моноклональных антител (МАТ) к дифференцировочным и активационным маркерам (CD34-Nab8158; CD45-Nab3088; фирма Abcam, США), меченных FITC и фикоэритрином (PE). Полученный клеточный состав ГПККМ указан в таблице.

Получение первичной смешанной культуры ККМ (без фракционирования)

Суспензию ККМ получали от животных по описанной выше методике и ресуспендировали в лизирующем растворе эритроциты (114 mM NH₄Cl; 7,5 mM KHCO₃; 100 мкМ EDTA). Полученную взвесь клеток ресуспендировали в растворе Хенкса (без Ca⁺² и Mg⁺²) и центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин и комнатной температуре t°=(22°C), затем удаляли надосадочную жидкость путем отсасывания и повторно центрифугировали. Полученный смешанный клеточный

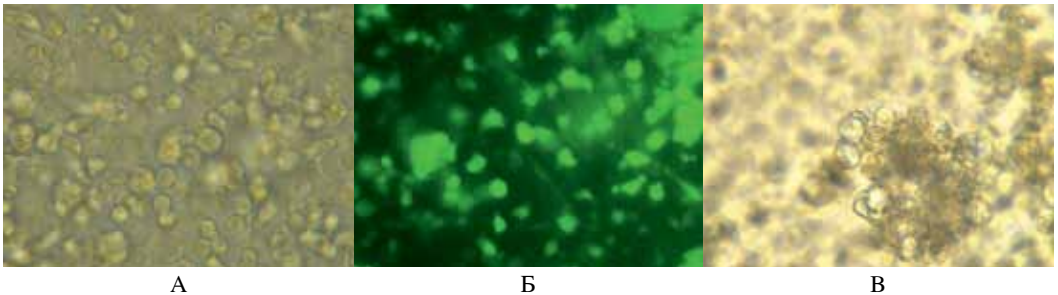


Рис. Культура гемопоэтических (моноклеарных) клеток костного мозга мышей различных линий. А, Б - 5-ти суточная культура неприкрепившихся гемопоэтических клеток (моноклеарная фракция) от доноров мышей В10.GFP; А. – Увел. X200 фазовый контраст; Б. – Увел. X200; люминесцентная микроскопия; В – 5 суточная культура неприкрепившихся гемопоэтических клеток (моноклеарная фракция) от доноров гетерозиготных мышей db/+, Увел. X200 фазовый контраст.

Фенотипическая характеристика гемопоэтической фракции стволовых клеток костного мозга

Отдельные популяции гемопоэтических стволовых и прогениторных ККМ

материал мы помещали в питательную среду (указанную выше) и культивировали в течение 5-7 дней.

Подготовка клеточного материала для трансплантации

Состав взвеси ГПКМ после культивирования в течение 5 суток

Соотношение клеточных популяций в концентрате стволовых клеток, %	После культивирования
1. Лимфоциты*)	80,2±9,6
2. Моноциты*)	18,7±1,3
3. Гранулоциты*)	1,1±1,4
4. CD34+/CD45+(по данным проточной цитометрии)	2,5±0,3

Примечание: *) – окраска по Романовскому-Гимза.

Подготовка гемопоэтических клеток костного мозга (ККМ). После завершения этапа культивирования (4-5 суток) культуру МНК 2-3 отмывали от среды с сывороткой раствором Хэнкса без Mg^{2+} и Ca^{2+} путем центрифугирования клеток при 1500 об/мин 5 мин при комнатной температуре (22°C).

Производили подсчет полученных клеток в камере Горяева и подготовленные для трансплантации клетки ресуспендировали в 500-1000 мкл (при внутривенном введении) раствора Хэнкса при комнатной температуре (22°C).

Выводы

1. Отработанная технология раздельного выделения из костного мозга и культивирования гемопоэтических стволовых клеток является адекватной (подтверждена методами фенотипического исследования), воспроизводимой и пригодной для применения в культуральной исследовательской работе.

2. Процедура культивирования клеток костного мозга является первым этапом клеточной терапии.

Method of cultivation and the phenotype characteristic of marrow hematopoietic cells (mononuclear fraction) from donors with a of green fluorescent protein gene

O.I. Stepanova, N.V. Kasinskaya, O.V. Baranova, Kh.Kh. Semenov,
A.O. Revyakin

Tested process of separate allocation from the stem hematopoietic and progenitor cells from healthy donors with green fluorescent protein gene. Tested a method of cultivation with their phenotyping in culture.

Key words: stem cells, hematopoietic fraction, green fluorescent protein gene.

Биологическое моделирование утомления при физических нагрузках

Е.Б. Шустов¹, В.Ц. Болотова²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»

² – ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия МЗ РФ»

Контактная информация: д.м.н., проф. Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

Представлены статистические характеристики биологической модели утомления при физических нагрузках, реализованной как методика челночного плавания мелких лабораторных животных – белых мышей, в том числе с дополнительным утяжелением. Показана возможность ее использования в фармакологических исследованиях для оценки влияния лекарственных средств на скоростные характеристики, работоспособность, выносливость и утомляемость животных.

Ключевые слова: утомление, работоспособность, методы биологического моделирования, челночное плавание, фармакологическая коррекция работоспособности.

Введение

В спорте хорошо известен методический подход к оценке скоростных качеств и выносливости спортсменов, связанный с многократным пробегом коротких дистанций (от 10 до 100 м, в зависимости от специализации спортсмена) – челночный бег. Важно отметить, что челночный бег достаточно хорошо имитирует специфические особенности физических нагрузок не столько бегунов, сколько спортсменов игровых видов спорта (баскетбол, футбол, хоккей). Существующие модификации челночного бега позволяют оценивать такие скоростные характеристики как стартовые и финишные рывки, ускорения, координату движений при смене направлений движения, а также выносливость спортсмена и особенности возникновения у него утомления (челночный бег до отказа) [4]. При этом время первого пробега дистанции отражает скоростные характеристики спортсмена, динамика

показателя времени повторных пробегов дистанции отражает утомление, суммарное время челночного плавания до отказа характеризует выносливость спортсмена, а суммарная дистанция пробега – его работоспособность. Таким образом, челночный бег до отказа является ценным методическим подходом, позволяющим в одном упражнении оценить основные параметры работоспособности спортсмена, его скоростные качества, выносливость, а также процесс формирования усталости. Этот же комплекс характеристик требуется оценить и при моделировании физических нагрузок у лабораторных животных, особенно при разработке средств фармакологической коррекции работоспособности.

Необходимо также учитывать, что динамика восстановления (или поддержания на приемлемом уровне) физической работоспособности является важной характеристикой практически любой лечебной технологии. Поэтому мето-

дика комплексного исследования физической работоспособности животных, являющихся биологическими моделями какого-либо заболевания и метода его лечения, проводимая в наиболее «мягком», физиологическом варианте физических нагрузок, будет также полезной и при доклинических исследованиях широкого круга новых медицинских средств [3].

Известные методы оценки физической работоспособности не позволяют в рамках одного исследования дать полную характеристику параметров работоспособности животных. Так, тесты вынужденного (предельного) плавания [6] или бега животных на тредбане характеризуют качества выносливости животных, тест на ротароде – координированность двигательных актов и выносливость, тест удержания на скользком вертикальном стержне – статический компонент выносливости, тест на силу хватки – силовую характеристику статического мышечного усилия [1, 2, 5]. Тест челночного плавания Киплинджера на скорость утомления [7] не оценивает скоростных характеристик, выносливости и работоспособности животных.

В связи с этим, мы попытались перенести методические подходы «челночного бега до отказа» на лабораторных животных, создав модификацию теста челночного плавания, пригодную для комплексной оценки основных характеристик физической работоспособности у животных. При этом мы учитывали, что методика должна предоставлять возможность в отдельных случаях (например, при выполнении исследований в интересах спорта высших достижений) менять интенсивность создаваемой нагрузки. Дополнительная нагрузка для животных может создаваться фиксацией к крестцовой зоне или хвосту груза, пропорционального массе тела.

Материалы и методы

Тест челночного плавания мелких лабораторных животных (белых мышей) осуществляется в специальном плавательном бассейне длиной 1,5 м, шириной не менее 20 см и глубиной не менее 40 см. Бассейн заполняется на половину своей глубины десатурированной водой температуры 22-24°C (десатурация осуществляется путем предварительного отстоя воды не менее 3 ч, для усиления процесса десатурации в воду погружается 2-3 марлевые ленты). Расстояние от уровня воды до верхней кромки бассейна должно быть не менее 10 см при использовании в исследовании мышей, 15 см – крыс. Для формирования стимула к плаванию животных в заданном направлении, в финишной зоне бассейна, над его торцевой стенкой, в недоступной для находящихся на уровне воды животных устанавливается проволочная кормушка, привлекающая обоняние.

Не менее чем за 2 ч до начала исследования животные лишаются корма и воды. Если это предусмотрено планом исследования, за 30 мин до его начала, после взвешивания животного, на нем дополнительно фиксируется утяжеляющий груз. Тестирование проводится одновременно на одном животном. Предварительно обученные плаванию в бассейне животные помещаются в воду в стартовой зоне головой по направлению к финишной зоне. Секундомер включается при начале перемещения животного в сторону финишной зоны и выключается при ее достижении. После этого животное без какого-либо периода отдыха сразу же возвращается лаборантом в стартовую зону для нового заплыва. Критерием завершения эксперимента является отказ животного от дальнейшего плавания в заданном направлении или превышение

критического периода продолжительности плавания (для длины бассейна 1,5 м – 60 сек). Далее животное извлекается из воды, обсушивается мягкой тканью и помещается в стандартную клетку.

Предварительное обучение животных плаванию осуществляется не менее чем в течение 3-х суток, с постепенным наращиванием расстояния от финишной зоны до стартовой, по 3-5 заплывов в день: в первый день расстояние проплыва составляет 50 см, во второй – 1 м, в третий – 1,5 м.

В протоколе исследования для каждого животного фиксируется его масса, груз утяжеления, номер заплыва и его продолжительность. В случае отказа животного в протоколе указывается критическое время – 60 сек.

Результаты исследований и их обсуждение

Усредненные по группе результаты челночного плавания животных (белых мышей-самцов массой 18-25 г) без дополнительного утяжеления представлены на рис. 1.

Анализ кривой длительности заплывов при челночном плавании позволяет выявить 4 области, различающиеся между собой. В зоне А (заплывы 1-10) отмечается устойчивая высокая скорость плавания, утомление животных не проявляется. У некоторых животных отмечается период вработывания (незначительное увеличение скорости плавания к 3-4-му заплыву) с последующим удержанием этой скорости до конца зоны А. Зона Б (11-20 заплывы) характеризуется начальными признаками утомления, при котором скорость плавания животных поддерживается на достаточно высоком уровне (увеличение времени заплыва примерно в 2 раза). Зона В (заплывы 21-55) характеризуется нарастающим утомлением, в ходе которого сначала у менее выносливых животных, а затем и животных со средним уровнем выносливости начинает отмечаться срыв работоспособности.

Характер срыва работоспособности у разных животных отличается. У некоторых животных он идет по типу равномер-

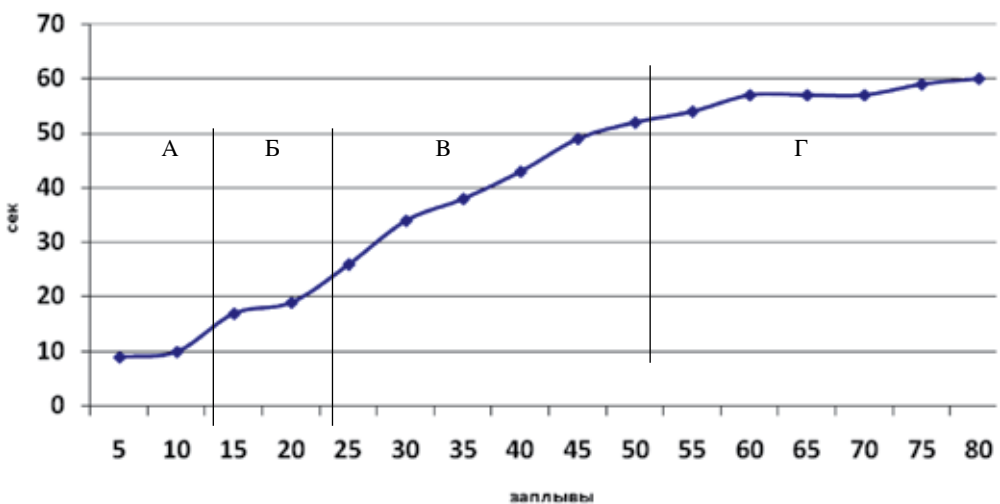


Рис. 1. Динамика средней длительности заплыва лабораторных мышей при челночном плавании.

ного нарастания утомления, у других – с резким нарастанием времени заплывов. Вероятно, различия в характере срыва работоспособности могут быть связаны с разным уровнем функциональных резервов животных и разной индивидуальной стратегией их использования. Так, встречались отдельные животные, у которых чередовалось заметное снижение скорости плавания в течение одного – двух заплывов (период отдыха) с последующим ее увеличением до среднегруппового уровня. Зона Г (заплывы 56-80) характеризуется выраженным утомлением и срывом работоспособности животных. Только единичные, особо выносливые животные еще сохраняют в этом диапазоне работоспособность на уровне, близком к 20% от исходного.

Таким образом, модель челночного плавания животных позволяет выявить и количественно оценить **скоростные характеристики** выполнения нагрузки (средняя скорость плавания в зоне А), собственно **работоспособность** (время удержания скорости плавания на высоком уровне – длительность фазы Б), **выносливость** (суммарная продолжительность (мин) и длительность (м) плавания до срыва работоспособности), а также **утомляемость**, или **скорость развития утомления** (отношение длительности предельного заплыва к их общему количеству; или в соответствии с подходом Киплинджера [7], коэффициент наклона линии регрессии длительности заплыва к их количеству). Дополнительным показателем, учитываемым в данной модели, может быть доля животных, отнесенных к группе с высокой выносливостью.

Для групповой характеристики скорости развития утомления линейную регрессионную модель целесообразно строить по усредненным значениям

длительности заплывов. Остальные показатели рассчитываются по индивидуальным данным с последующим усреднением и определением стандартного отклонения от средних значений. Кроме того, можно условно распределить животных по диапазонам выносливости. Границей диапазона высокой выносливости, в соответствии с принципами S-образного шкалирования, будет уровень последних 16-20% животных по кривой частотного анализа. В нашем случае такой границей высокой выносливости будет 50-й заплыв, при преодолении которого животное может быть отнесено к этой группе. В исследуемой группе к высоко выносливым животным можно было отнести 20% мышей.

Описанная модель челночного плавания достаточно полно характеризует работоспособность, выносливость и скорость развития утомления у лабораторных животных в обычных условиях. Однако в практике спорта высших достижений, а также медицине экстремальных состояний не редки ситуации, когда интенсивность физических нагрузок существенно выше, чем при выполнении даже интенсивной работы в обычных условиях, или же на организм воздействует какой-либо дополнительный неблагоприятный фактор (нагрузки в условиях гипоксии, при выраженном предшествующем утомлении, наличии острого или обострении хронического заболевания сердечно-сосудистой или дыхательной систем). В этих ситуациях для большей адекватности необходимо ввести в экспериментальную модель утомления фактор дополнительной нагрузки. На модели челночного плавания таким фактором может быть дополнительное утяжеление животного (прикрепленный груз, равный 2,5% от массы тела).

График динамики челночного плавания животных с утяжелением представлен на рис. 2. Сопоставление основных характеристик методики челночного плавания с дополнительным грузом и без него представлено в табл. 1.

низком количестве заплывов (21-60 заплывов до полного срыва работоспособности, по сравнению с 55-80 заплывами в модели без утяжеления).

Частотные распределения моментов полного срыва работоспособности (дли-

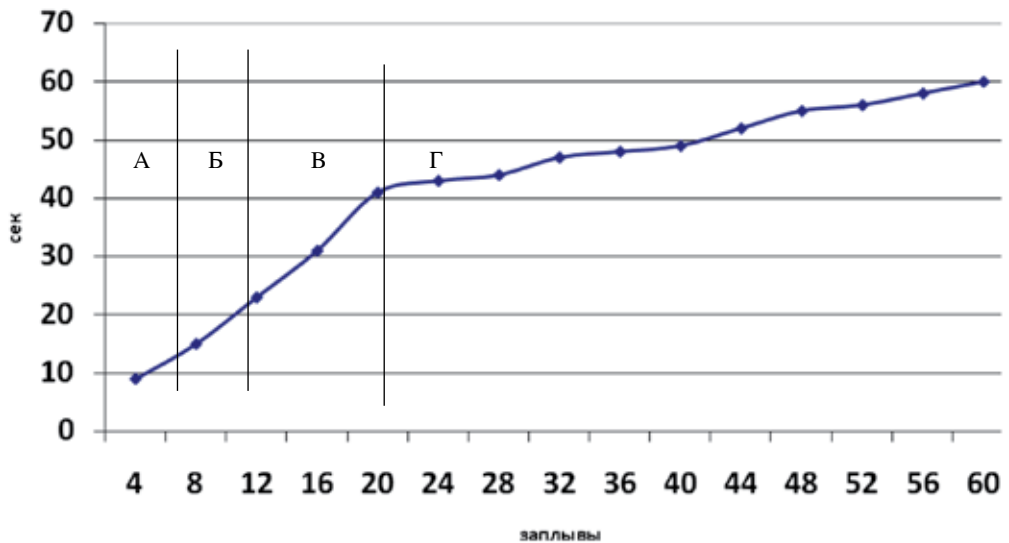


Рис. 2. Динамика времени заплывов лабораторных животных при челночном плавании с утяжелением, равным 2,5% от массы тела.

Сопоставление рис. 1 и 2 показывает, что начальная скорость плавания животных в обеих моделях совпадает, но зона А с 10-ти заплывов сокращается до 4-5, а зона Б (удержания работоспособности на высоком уровне) сокращается с 20-ти заплывов до 8-10. Зона нарастающего утомления (зона В) характеризуется более быстрым утомлением (в среднем, 12-20 заплывов, а не 20-55, как в плавании без утяжеления). Зона срыва работоспособности (зона Г, граница – точка перегиба на графике) начинается при меньшей степени утомления (25-28% от исходной скорости плавания, в модели без утяжеления – при 18-20% от исходной скорости плавания) и при существенно более

тельностью заплыва 60 сек и более) у лабораторных животных в моделях челночного плавания с утяжелением и без него представлены на рис. 3. Если в модели без утяжеления частотное распределение имеет характер, приводимый методами нормализации (z- и T-нормирование, стенирование) к нормальному статистическому распределению со средним значением в области 38-ми заплывов, то модель с утяжелением имеет характер распределения, существенно отличающийся от нормального. Область максимума распределения смещена в левую часть (среднее значение соответствует 27-му заплыву), без начальной зоны малой частоты встречаемости, что является

признаком экстремальности воздействия. В то же время, исходя из особенностей частотной кривой в области высоких значений количества заплывов, можно определить границу диапазона высокой выносливости животных: сохранение работоспособности более 45-ти заплывов в модели с дополнительным утяжелением и 50-ти заплывов – в модели без утяжеления. Доля высоко выносливых животных в обеих моделях составляет 20%.

более достоверной. Однако увеличение при этом степени экстремальности воздействия на животных может стать препятствием к применению такой модели в доклинических исследованиях различных лечебных и реабилитационных технологий.

Обе модели челночного плавания (с грузом или без) могут быть успешно применены для проведения фармакологических исследований в рамках разработки

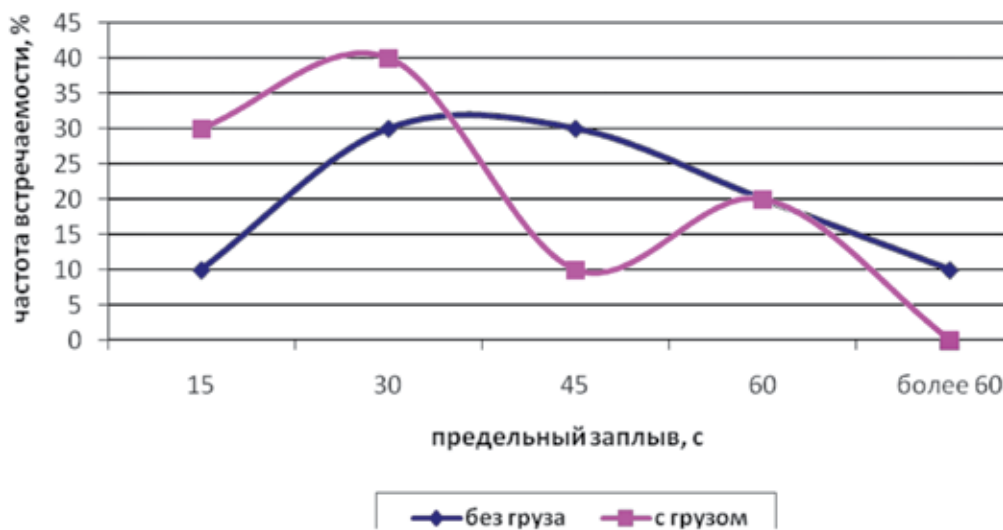


Рис. 3. Частотное распределение срывов работоспособности в моделях челночного плавания.

Таким образом, за исключением показателя скорости плавания на стартовом этапе, остальные параметры, характеризующие работоспособность, выносливость и развитие утомления, в моделях челночного плавания с дополнительным утяжелением и без него имеют тенденцию к статистическим отличиям. Модель с дополнительным утяжелением в 2,5% от массы тела характеризуется как вызывающая, в среднем, на 20-30% более выраженное утомление лабораторных животных. Вероятно, прибавление груза до 4,5-5% сделает расходимость моделей

средств, замедляющих развитие утомления. Для подтверждения адекватности модели представлены результаты выполненного нами исследования по сравнительной оценке влияния на физическую работоспособность животных некоторых органических солей кислот цикла Кребса.

Исследование выполнено на двух моделях челночного плавания животных (с дополнительным утяжелением и без), позволяющих достаточно полно характеризовать процессы утомления у лабораторных животных. Тестируемые препараты вводились перорально

Различия между моделями челночного плавания (средние по группе, $M \pm m$)

Показатель		Модели плавания		Отличия и их достоверность
Обозначение	Наименование	Без груза	Груз 2,5%	
V1	Скорость плавания, стартовая фаза, м/мин	10,9±1,0	10,7±2,5	-2%, p=0,81
T1	Время удержания высокой работоспособности, с	240±120	158±126	-34%, p=0,15
Lmax	Суммарная дистанция плавания до отказа, м	57±27	41±25	-28%, p=0,17
Tmax	Суммарное время плавания до отказа, мин	11,1±7,1	8,2±4,5	-26%, p=0,30
K1	Утомляемость, ед.	2,0±1,2	2,9±1,4	+45%, p=0,12
K2	Скорость развития утомления (коэффициент линейной регрессии, ед)	1,06	1,28	+21%, p=0,21
K3	Доля животных с высокой выносливостью, %	20	20	0%, p=1,0

Примечание: достоверность отличий для показателей V1, T1, Lmax, Tmax, K1 оценивалась методом однофакторного дисперсионного анализа, для показателей K2, K3 – методом точной вероятности Фишера.

через зонд, в дозе 50 мг/кг, однократно, за 1 ч до исследования. Лабораторные животные содержались в стандартных условиях вивария. Контрольным животным вводился физиологический раствор в эквивалентных количествах. В качестве стандартного препарата сравнения (контроль 2) использовался препарат из группы актопротекторов Метапрот (этилтиобензимидазола гидробромид), предназначенный для сохранения и повышения работоспособности в обычных и осложненных условиях, в дозе 50 мг/кг. Результаты исследования представлены в табл. 2 и 3, на рис. 4 и 5.

Анализ полученных данных показывает, что в тесте челночного плавания без утяжеления 3 исследуемых препарата оказывали заметное влияние на процессы утомления: Метапрот, фумарат и сукцинат представленных органических производных. Малатные соли имели слабо выраженный эффект.

Введение в модель челночного плавания дополнительной нагрузки в виде утяжеления привело к тому, что только 2 препарата – Метапрот и R-фумарат – стали умеренно снижать скорость появления утомления, а использование сукцината и малата приводило даже к некоторому ускорению утомляемости (графики лежат выше линии контроля).

Выводы

1. Модель челночного плавания мелких лабораторных животных является адекватной для комплексной оценки скоростных характеристик, работоспособности, выносливости и особенностей возникновения утомления при физических нагрузках.

2. Результаты челночного плавания животных без дополнительного утяжеления, после выполнения процедур нормализации, могут быть распространены на генеральную совокупность животных,

Таблица 2

Влияние фармакологических средств (R-соль) на показатели челночного плавания животных без дополнительной нагрузки (средние по группе, $M \pm m$)

Показатель	Контроль (физ. р-р)	R-фумарат	R-сукцинат	R-L-малат	R-LD-малат	Контроль 2 (Метапрот)
V1	10,9±1,0	11,5±0,8	11,6±1,6	10,7±1,7	12,4±2,3 *	11,9±1,9
T1	240±120	438±231**	440±220**	334±198	333±106	495±378*
Lmax	57±27	71±34	76±17	60±21	66±22	116±35***
Tmax	11,1±7,1	13,4±6,4	12,6±3,1	10,8±3,1	11,6±4,6	19,5±4,6**
K1	2,00±1,21	1,82±1,58	1,24±0,27	1,65±0,60	1,48±0,44	0,84±0,26*
K2	1,06	0,80	0,79	0,95	0,86	0,51*
K3	20	40	60	20	40	80***
Интегральная оценка	1,00	1,27*	1,34*	1,09	1,20	1,66**

Примечание: 1) достоверность отличий для показателей V1, T1, Lmax, Tmax, K1 оценивалась методом однофакторного дисперсионного анализа, для показателей K2, K3 и интегральной оценки – методом точной вероятности Фишера для четырехпольной таблицы;

2) отличия от плацебо достоверны: * – $p < 0,1$; ** – $p < 0,05$; *** – $p < 0,01$.

Таблица 3

Влияние фармакологических средств (R-соль) на показатели челночного плавания животных в условиях дополнительной нагрузки (средние по группе, $M \pm m$)

Показатель	Контроль (физ. р-р)	R-фумарат	R-сукцинат	R-L-малат	R-LD-малат	Контроль 2 (Метапрот)
V1	10,7±2,5	8,6±1,9	10,0±1,5	9,8±1,8	11,4±2,2	9,8±2,9
T1	158±126	327±207*	143±84	148±112	165±71	270±211
Lmax	41±25	57±37	30±17	35±18	41±14	52±33
Tmax	8,2±4,5	11,3±6,3	6,4±2,6	7,6±2,9	7,8±2,8	10,1±4,3
K1	2,9±1,4	2,3±1,5	3,6±1,6	3,4±1,9	2,4±0,6	2,3±1,2
K2	1,28	0,91*	1,42	1,55	1,30	0,88*
K3	20	40	0	0	20	20
Интегральная оценка	1,00	1,33*	0,83	0,86	1,03	1,21*

Примечание: 1) достоверность отличий для показателей V1, T1, Lmax, Tmax, K1 оценивалась методом однофакторного дисперсионного анализа, для показателей K2, K3 и интегральной оценки – методом точной вероятности Фишера для четырехпольной таблицы;

2) отличия от плацебо достоверны: * – $p < 0,1$; ** – $p < 0,05$; *** – $p < 0,01$.

и, следовательно, в дальнейшем анализироваться методами параметрического анализа. Статистическая обработка результатов челночного плавания животных с дополнительным утяжелением (кроме показателя скорости плавания) будет корректна только при применении непараметрических методов статистики.

3. При выполнении исследований в интересах спорта высших достижений и экстремальной медицины в модель необходимо вводить дополнительное утяжеление животных, составляющее не менее чем 2,5% от их массы.

4. Исследуемые соединения – производные солей кислот цикла Кребса могут

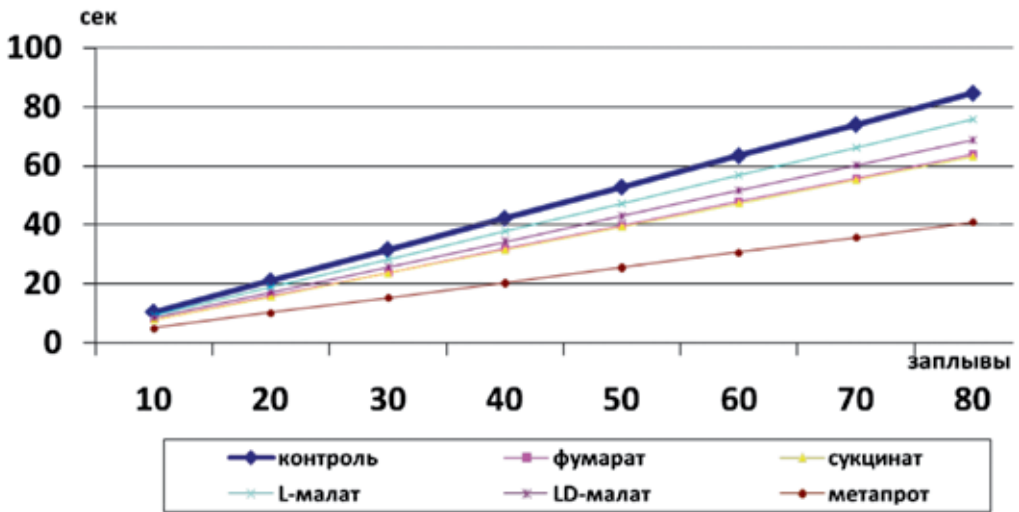


Рис. 4. Графики линейных регрессионных функций показателя утомляемости в тесте челночного плавания без дополнительного утяжеления.

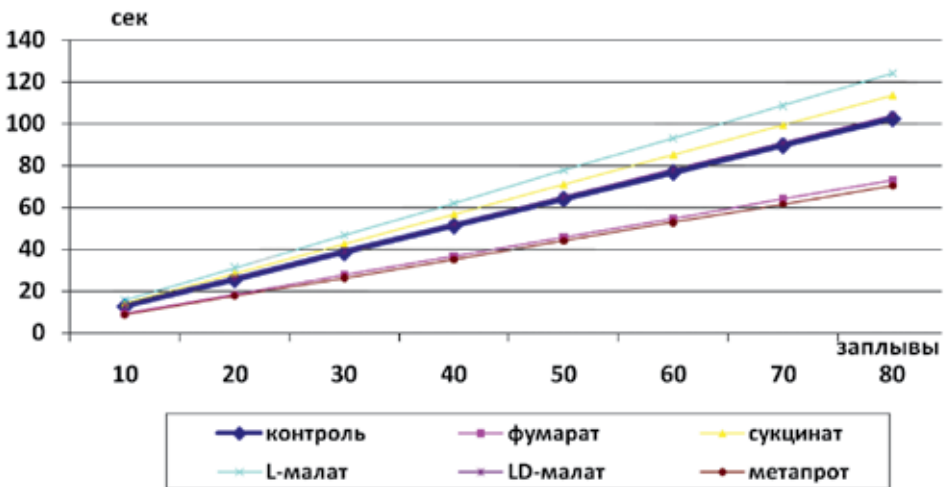


Рис. 5. Графики линейных регрессионных функций показателя утомляемости в тесте челночного плавания с дополнительным утяжелением, равным 2,5% от массы тела.

быть перспективными для дальнейшего изучения в качестве средств, замедляющих процесс утомления при физической нагрузке.

Список литературы

1. Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н. Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии

// Спортивная медицина. № 1. 2013. С. 7-17.

2. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В, Казакова Л.Х., Алимкина О.В., Касинская Н.В. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине // Биомедицина. 2012. № 4. С. 15-21.

3. **Каркищенко Н.Н.** Альтернативы биомедицины. Том 1. Основы биомедицины и фармако моделирования. – М.: Изд-во ВПК. 2007. 320 с.
4. **Карпман В.Л.** Тестирование в спортивной медицине. – М.: Физкультура и спорт. 1988. 129 с.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
6. **Рылова М.Л.** Методы исследования хронического действия вредных факторов в эксперименте. – Л.: Медицина. 1964. 148 с.
7. **Kiplinger G.L.** The effects of drugs on the rate of development on fatigue in mice // Texas Rep. biol. med. 1967. V. 25. P. 531-540.

Biological modeling of fatigue during physical activities

Е.В. Shustov, V.Ts. Bolotova

Statistical characteristics are submitted of the biological models of fatigue during physical activities, practiced as a technique of shuttle swimming of small laboratory animals – white mice, including with additional weighting. Possibility of its use in pharmacological researches to assess the effects of medicines on high-speed characteristics, working capacity, endurance and fatigue of animals is shown.

Key words: fatigue, working capacity, methods of biological modeling, shuttle swimming, pharmacological correction of working capacity.